

# **Análisis bioquímico y molecular de la ruta de la lipoxigenasa en relación a la generación del aroma del aceite de oliva virgen**

**Tesis Doctoral**

**M<sup>a</sup> Lourdes García Vico**  
**Sevilla 2017**







## **INSTITUTO DE LA GRASA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales



## **UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE**

Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

# **Análisis bioquímico y molecular de la lipoxigenasa en relación a la generación del aroma del aceite de oliva virgen**

Memoria presentada por M<sup>a</sup> Lourdes García Vico, Lda. en Bioquímica, para optar al  
grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide

Fdo. M<sup>a</sup> Lourdes García Vico



Autorizamos la presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Análisis bioquímico y molecular de la ruta de la lipoxigenasa en relación a la generación del aroma del aceite de oliva virgen**”, realizada por Dña. M<sup>a</sup> Lourdes García Vico en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales del Instituto de la Grasa (CSIC) bajo nuestra dirección.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Sevilla, a 8 de Mayo de 2017.

V.º B.º

Los Directores



**L. Carlos Sanz Martínez**

Profesor de Investigación del CSIC



**José Manuel Martínez Rivas**

Científico titular del CSIC

Conforme la tutora



**Mónica Venegas Calerón**



**A mis hijos, Carmen y Álvaro**





## **AGRADECIMIENTOS**

A lo largo de los más de cuatro años que he dedicado a esta Tesis Doctoral he tenido la oportunidad de compartir vivencias con un gran número de personas con las que he compartido muy buenos momentos, en el ámbito profesional y en el personal, por lo que me gustaría dedicar estas líneas a todas aquellas personas que, de algún modo, han contribuido a que esta Tesis Doctoral se haya podido llevar a cabo.

En primer lugar quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, el Dr. L. Carlos Sanz Martínez y el Dr. José Manuel Martínez Rivas, por haber confiado en mí y dedicarme su valioso tiempo y conocimientos.

Quisiera extender este agradecimiento a la Dra. Ana Gracia Pérez Rubio, por su comprensión y empatía y por dedicarme su tiempo y sus conocimientos cuando ha sido necesario.

A la Dra. Mónica Venegas Calerón por acceder a mi tutoría.

Agradecer al Profesor Wilfried Schwab y a su grupo por acogerme durante tres meses en su laboratorio en Freising (Alemania), una experiencia realmente enriquecedora.

A mis compañeras y amigas, la Dra. Carmen Romero Segura, la Dra. Rosa García Rodríguez y Mar, a las que he echado mucho de menos en esta última etapa, con las que he compartido muy buenos momentos tanto dentro como fuera del Instituto.

Agradecer también a mis compañeros el Dr. David Velázquez y Lola, con los que ha resultado muy fácil trabajar, y en especial a la Dra. Luisa Hernández por transmitirme sus conocimientos en el campo de la Biología Molecular.

También quisiera agradecer a mis compañeros de “sala”, Juanlu y Patricia, porque han hecho que esta última etapa de escritura sea mucho más amena.

Quisiera hacer extensible este agradecimiento a la antigua “primera planta del Instituto de la Grasa” por los buenos momentos que me han brindado, en especial al Dr. Arturo Morales, Pili y a la Dra. Susana Marmesat; y de alguna manera a todas aquellas personas con las que he coincidido a diario y que siempre han mostrado interés por el transcurso de este trabajo.

Por último, quisiera demostrar mi agradecimiento a mi familia y amigos por su constante y reiterada preocupación en la evolución de este trabajo. A mi queridísima amiga Celia, que ha sido un apoyo muy importante en estos años de trabajo y con la que he compartido vivencias únicas en nuestra estancia en Freising (Alemania). A mis hermanos Jorge y Álvaro y a mis padres, Lourdes y Manuel, por su incondicional apoyo, cariño y amor, sin vosotros no sería quién soy. A mis hijos, Carmen y Álvaro, porque sin ellos saberlo, son los principales motores de mi vida; y a José Carlos por su paciencia y comprensión.

Este trabajo ha sido financiado mediante ayudas a la investigación concedidas por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-24442). Durante el período 2012-2016 he sido beneficiaria de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Economía y Competitividad.



**“Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar”**

Hipatia de Alejandría





TESIS DOCTORAL

**Análisis bioquímico y molecular de la  
ruta de la lipoxigenasa en relación a  
la generación del aroma del aceite de  
oliva virgen**

M<sup>a</sup> Lourdes García Vico

Sevilla 2017



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. EL OLIVO Y EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN .....</b>	<b>1</b>
I.1.1. El olivo y su fruto .....	1
I.1.2. El aceite de oliva virgen.....	6
I.1.2.1. Proceso de obtención del aceite de oliva virgen.....	6
I.1.2.2. Clasificación del aceite de oliva .....	9
I.1.2.3. Composición del aceite de oliva virgen .....	10
<b>I.2. EL FLAVOR DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN .....</b>	<b>13</b>
<b>I.3. LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN .....</b>	<b>18</b>
I.3.1. Biogénesis de los compuestos volátiles .....	18
I.3.1.1. Oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. La reacción de la lipoxigenasa.....	21
I.3.1.2. Escisión de hidroperóxidos de ácidos grasos. La reacción catalizada por la hidroperóxido liasa.....	23
I.3.1.3. Formación de alcoholes volátiles. La reacción de la alcohol deshidrogenasa .....	24
I.3.1.4. Formación de ésteres. La reacción de la alcohol aciltransferasa.....	25
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>III.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....</b>	<b>31</b>
III.1.1. Olivo.....	31
III.1.1.1. Variedades y condiciones de cultivo .....	31
III.1.1.2. Tejidos utilizados.....	33
III.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	34

III.1.2.1. Estirpes empleadas.....	34
III.1.2.2. Condiciones de cultivo .....	35
III.2. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA .....	36
III.2.1. Transformación genética de <i>E. coli</i> .....	36
III.2.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	37
III.2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	37
III.2.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	38
III.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción .....	38
III.2.6. Ligación de fragmentos de DNA .....	38
III.2.7. Determinación y análisis de secuencias de DNA.....	38
III.2.8. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.....	39
III.2.9. Purificación de productos de PCR .....	40
III.3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA .....	40
III.3.1. Aislamiento de RNA de tejidos de olivo.....	40
III.3.1.1. Aislamiento de RNA de mesocarpo y semillas de olivo .....	40
III.3.1.2. Aislamiento de RNA de hojas de olivo .....	41
III.3.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa .....	41
III.3.3. Síntesis de cDNA .....	41
III.3.4. Análisis de RNA mediante PCR cuantitativa en tiempo real.....	42
III.4. AISLAMIENTO DE UN CLON DE cDNA CORRESPONDIENTE A UNA LIPOXIGENASA DE OLIVO .....	46
III.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE TEJIDOS DE OLIVO .....	46
III.5.1. Obtención de extractos crudos de mesocarpo de aceituna .....	46
III.5.2. Obtención de extractos crudos de semilla de aceituna.....	47
III.5.3. Obtención de extractos crudos de hoja.....	47
III.6. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	48
III.6.1. Lipoxigenasa .....	48

III.6.2. Hidroperóxido liasa.....	48
III.6.3. Alcohol deshidrogenasa .....	49
III.6.4. Alcohol aciltransferasa.....	49
III.7. ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES .....	50
III.7.1. Extracción de aceite de oliva virgen .....	50
III.7.2. Obtención de homogeneizados de mesocarpo de aceituna .....	50
III.7.3. Obtención de homogeneizados de hoja de olivo.....	51
III.7.4. Análisis de compuestos volátiles mediante SPME/HRGC .....	51
III.8. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	58
III.8.1. Determinación de la concentración de proteínas .....	58
III.8.2. Cuantificación de ácidos nucleicos .....	58
III.9. REACTIVOS Y APARATOS .....	58
III.9.1. Reactivos .....	58
III.9.2. Aparatos .....	59
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
IV.1. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE UN cDNA CORRESPONDIENTE A UNA LIPOXIGENASA DE OLIVO.....	63
IV.1.1. Aislamiento de un clon de cDNA .....	63
IV.1.2. Análisis de la secuencia .....	63
IV.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>Oe3LOX2</i> .....	68
IV.2.1. Regulación espacial y temporal .....	68
IV.2.2. Efecto del régimen hídrico.....	71
IV.2.3. Efecto de distintos estreses abióticos .....	72
IV.2.3.1. Efecto de la temperatura .....	73
IV.2.3.2. Efecto de la oscuridad.....	74
IV.2.3.3. Efecto de la herida .....	75
IV.3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL OLIVO EN RELACIÓN CON LA FRACCIÓN VOLÁTIL DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN .....	76



IV.4. ESTUDIO METABÓLICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA BIOSÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DEL ACEITE EN LINEAS DE OLIVO SELECCIONADAS CON DIFERENTE FONDO GENÉTICO (VARIEDADES) .....	90
IV.4.1. Análisis de los compuestos volátiles del aceite de las variedades seleccionadas de la colección CN-36.....	90
IV.4.2. Niveles de actividad de las enzimas de la ruta LOX de las variedades seleccionadas de la CN-36 .....	95
IV.4.3. Niveles de expresión de los genes <i>LOX2</i> y <i>HPL</i> de las variedades seleccionadas de la colección CN-36.....	100
IV.4.4. Correlaciones entre metabolitos, actividad enzimática y expresión génica en las variedades seleccionadas de la colección CN-36 .....	105
IV.5. ESTUDIO METABÓLICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES DEL ACEITE EN LINEAS DE OLIVO SELECCIONADAS CON EL MISMO FONDO GENÉTICO (CRUZAMIENTOS PICUAL X ARBEQUINA).....	107
IV.5.1. Análisis de compuestos volátiles en homogeneizados obtenidos de mesocarpio de aceituna .....	107
IV.5.2. Análisis de los compuestos volátiles del aceite de líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina .....	108
IV.5.3. Niveles de actividad de las enzimas de la ruta LOX de líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina .....	112
IV.5.4. Niveles de expresión de los genes <i>LOX2</i> y <i>HPL</i> de las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina .....	117
IV.5.5. Correlaciones entre metabolitos, actividad enzimática y expresión génica en las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina .....	122
IV.6. ESTUDIO DE GENÓMICA FUNCIONAL DE LA 13-HIDROPERÓXIDO LIASA DE OLIVO EN RELACIÓN A SU PAPEL EN LA BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS VOLATILES DEL ACEITE DE OLIVA .....	124
IV.6.1. Caracterización de las plantas de olivo transformadas con el gen <i>OepHPL</i> .....	125

IV.6.1.1. Niveles de expresión del gen <i>OeHPL</i> .....	125
IV.6.1.2. Niveles de actividad de la enzima HPL.....	129
IV.6.1.3. Nivel de compuestos volátiles .....	129
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>135</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>151</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>155</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Forma y tamaño típico de un olivo .....	3
Figura 2. Estado fenológico de la aceituna.....	4
Figura 3. Corte transversal de una aceituna.....	5
Figura 4. Factores condicionantes de las características cualitativas del aceite de oliva ..	7
Figura 5. Ruta de biosíntesis de compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen a partir de ácido linolénico .....	20
Figura 6. Aspecto y estadios de desarrollo y maduración de las aceitunas de la variedad Picual utilizadas en este trabajo.....	32
Figura 7. Aspecto y estadios de desarrollo y maduración de las aceitunas de la variedad Arbequina utilizadas en este trabajo.....	33
Figura 8. Curva de amplificación de la qRT-PCR .....	44
Figura 9. Identificación de compuestos volátiles en el aceite de oliva virgen por análisis SPME-GC-MS.....	57
Figura 10. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes <i>LOX</i> de olivo .....	66
Figura 11. Análisis filogenético de las enzimas LOX de plantas .....	67
Figura 12. Niveles de expresión relativa del gen <i>Oe3LOX2</i> en diferentes tejidos de las variedades Picual y Arbequina .....	69
Figura 13. Evolución de los niveles de expresión relativa del gen <i>Oe3LOX2</i> en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina a lo largo del desarrollo y maduración del fruto.....	70
Figura 14. Evolución de los niveles de expresión relativa del gen <i>Oe3LOX2</i> en semilla de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina, a lo largo del desarrollo y maduración del fruto.....	71
Figura 15. Efecto del régimen hídrico sobre los niveles de expresión relativa del gen <i>Oe3LOX2</i> en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina .....	72
Figura 16. Efecto de la temperatura baja sobre los niveles de expresión relativa del gen <i>Oe3LOX2</i> en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina .....	73

Figura 17. Efecto de la temperatura alta sobre los niveles de expresión relativa del gen <i>Oe3LOX2</i> en mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina.....	74
Figura 18. Efecto de la oscuridad sobre los niveles de expresión relativa del gen <i>Oe3LOX2</i> en mesocarpo de aceituna de las variedades Picual y Arbequina.....	75
Figura 19. Efecto de la herida sobre los niveles de expresión relativa del gen <i>Oe3LOX2</i> en mesocarpo de aceituna de las variedades Picual y Arbequina.....	76
Figura 20. Variabilidad del perfil metabólico de las variedades de la CN-36 analizadas .....	86
Figura 21. Distribución vectorial de los principales compuestos volátiles presentes en los aceites de las variedades de la CN-36.....	87
Figura 22. Distribución vectorial de compuestos volátiles seleccionados por su contribución al aroma (UAO > 1) en los aceites de las variedades de la CN-36 .....	89
Figura 23. Evolución del contenido de compuestos volátiles en aceites de las variedades CN-36 seleccionadas obtenidos de frutos a lo largo de la maduración .....	94
Figura 24. Evolución de los niveles de actividad de las cuatro enzimas principales de la ruta de la lipoxigenasa, en mesocarpo de aceitunas de las variedades seleccionadas de la colección CN-36 a lo largo de la maduración del fruto.....	100
Figura 25. Evolución de los niveles de expresión relativa de los genes <i>Oe1LOX2</i> , <i>Oe2LOX2</i> , <i>Oe3LOX2</i> y <i>OeHPL</i> en mesocarpo de aceitunas de las variedades seleccionadas de la CN-36 a lo largo de la maduración del fruto .....	104
Figura 26. Evolución del contenido de compuestos volátiles en homogeneizados de las líneas del cruzamiento Picual x Arbequina seleccionadas, obtenidos de frutos a lo largo de la maduración.....	112
Figura 27. Evolución de los niveles de actividad de las cuatro enzimas principales de la ruta de la lipoxigenasa, en mesocarpo de aceitunas de las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina a lo largo de la maduración del fruto .....	116
Figura 28. Evolución de los niveles de expresión relativa de los genes <i>Oe1LOX2</i> , <i>Oe2LOX2</i> , <i>Oe3LOX2</i> y <i>OeHPL</i> en mesocarpo de aceitunas de las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina a lo largo de la maduración del fruto .....	121
Figura 29. Niveles de expresión relativa del gen <i>OeHPL</i> en hojas de líneas transgénicas de olivo .....	127



Figura 30. Fenotipo de las líneas transgénicas de olivo .....	128
Figura 31. Niveles de actividad enzimática HPL en hojas de líneas transgénicas de olivo .....	129
Figura 32. Contenido de compuestos volátiles en hojas de líneas transgénicas de olivo .....	132
Figura 33. Ruta de biosíntesis de compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen a partir de ácido linolénico, en hojas que presentan silenciamiento del gen <i>OeHPL</i> .....	148



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evolución en el consumo de AOV (en miles de toneladas) tanto en países productores como no productores en las campañas 2010-2014 .....	2
Tabla 2. Valores umbrales y descriptores sensoriales de compuestos volátiles identificados en el aceite de oliva virgen.....	15
Tabla 3. Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.....	35
Tabla 4. DNA polimerasas empleadas en este trabajo .....	39
Tabla 5. Oligonucleótidos para qRT-PCR empleados en este trabajo .....	43
Tabla 6. Identificación de compuestos volátiles en el aceite de oliva virgen por análisis SPME-GC-MS.....	52
Tabla 7. Variedades de olivo de la colección nuclear CN-36 .....	77
Tabla 8. Variabilidad y distribución del contenido de volátiles (ng/g de aceite) en los aceites procedentes de la CN-36 del BMGO.....	81
Tabla 9. Variedades seleccionadas a partir del estudio de la CN-36 para seguimiento de su evolución durante el proceso de maduración del fruto .....	90
Tabla 10. Coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) entre variables metabólicas, bioquímicas y moleculares de las variedades seleccionadas de la colección nuclear CN-36 .....	106
Tabla 11. Variedades con similar fondo genético seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina para seguimiento durante el proceso de maduración del fruto .....	107
Tabla 12. Correlaciones obtenidas tras el análisis y comparación de los compuestos volátiles obtenidos en aceites y en homogeneizados de mesocarpo de aceituna.....	108
Tabla 13. Coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) entre variables metabólicas, bioquímicas y moleculares de las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina. ....	123

## ABREVIATURAS

<b>AAT</b>	Alcohol aciltransferasa
<b>ADH</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>AOS</b>	Óxido de aleno sintasa
<b>AOV</b>	Aceite de oliva virgen
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>C5</b>	Compuestos volátiles de cinco átomos de carbono
<b>C6</b>	Compuestos volátiles de seis átomos de carbono
<b>CaMV</b>	Virus del mosaico de la coliflor
<b>COI</b>	Consejo oleícola internacional
<b>Ct</b>	Ciclo umbral
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetraacético
<b>ESTs</b>	<i>Expressed sequence tags</i>
<b>FID</b>	Detector de ionización de llama
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
<b>HPL</b>	Hidroperóxido liasa
<b>HRGC</b>	Cromatografía de gases de alta resolución
<b>IM</b>	Índice de maduración

<b>JA</b>	Ácido jasmónico
<b>LA</b>	Ácido linoleico
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LnA</b>	Ácido linolénico
<b>LOX</b>	Lipoxigenasa
<b>MOPS</b>	Ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PMSF</b>	Fluoruro de sulfurilfenilmetano
<b>PVPP</b>	Polivinil polipirrolidona
<b>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real
<b>RNAi</b>	ARN interferente
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SDF</b>	Semanas después de floración
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SPME</b>	Microextracción en fase sólida
<b>UAO</b>	Unidades activas de olor
<b>UBQ</b>	Ubiquitina
<b>MS</b>	Espectrometría de masas



# **I. Introducción**



## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. EL OLIVO Y EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN**

#### **I.1.1. El olivo y su fruto**

El cultivo del olivo se ha venido desarrollando desde tiempos inmemoriales hasta la actualidad, situándose a día de hoy entre los más importantes del área mediterránea. Todo apunta a que su origen se sitúa en las antiguas Persia y Mesopotamia (Boskou, 1996), expandiéndose posteriormente a Occidente hasta convertirse en la planta oleaginosa por antonomasia del mundo mediterráneo. La incesante actividad comercial de los fenicios los convirtió en importantes agentes propagadores del olivo y de las técnicas de extracción del aceite, siendo los primeros en implantar la cultura oleícola en la Península Ibérica a mediados del siglo XI a. C., concretamente en las regiones situadas en los valles de los ríos Guadalquivir y Genil. A pesar de que existen pruebas que apuntan a que los griegos ya difundieron en los países más occidentales del Mediterráneo su tradición olivarera entre los siglos VI y VII a. C., fueron realmente los romanos los que consolidaron el cultivo en Hispania y lo expandieron desde la provincia Bética hacia el norte, intensificando la actividad comercial y contribuyendo al desarrollo tecnológico. Posteriormente, los árabes difundían en la Península Ibérica los fundamentos agrícolas griegos, cartagineses, romanos y suyos propios, mejorando las técnicas del cultivo y elaboración del aceite, así como las de fabricación de grandes recipientes para su almacenamiento, siendo los descubridores de muchos de los usos culinarios y medicinales que aún hoy continúan vigentes y sentando definitivamente los vocablos castellanos de aceituna, aceite o almazara. A partir del siglo XV, con los viajes transoceánicos de Colón, Magallanes y Juan Sebastián Elcano, el cultivo se extendió por el Nuevo Mundo. En la actualidad, el olivo también se cultiva en Sudáfrica, China y Australia.

El hábitat del olivo se concentra, tanto en el hemisferio norte como en el sur, en regiones climáticas de tipo mediterráneo caracterizadas por veranos secos y calurosos. El patrimonio oleícola existente se estima en aproximadamente 1.000 millones de olivos, ocupando una superficie de aproximadamente 10 millones de ha. La producción anual de aceituna es de alrededor de 16 millones de toneladas, de las que un 90% se destina a la producción de aceite y un 10% a la elaboración de aceituna de mesa.



El volumen del consumo mundial de aceite de oliva durante el periodo 1990/91-2014/15 se multiplicó por 1,7. Esta evolución tiene como principal característica el crecimiento del consumo en los países no miembros del Consejo Oleícola Internacional (COI) que aumenta regularmente en las últimas dos décadas pasando de representar el 11% del consumo mundial en 1990/91, al 24% en 2014/15. Entre estos, la evolución más espectacular del consumo ha tenido lugar en Estados Unidos durante los últimos años (Tab. 1).

**Tabla 1. Evolución en el consumo de AOV (en miles de toneladas) tanto en países productores como no productores en las campañas 2010-2014.**

	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015
Albania	9,00	8,00	13,00	11,50	13,00
Argelia	59,00	42,50	60,50	48,50	45,50
Chipre	5,50	6,00	6,00	6,00	6,00
Croacia	7,00	6,00	6,00		
Egipto	5,00	7,50	12,00	8,50	15,00
Irán	7,50	11,00	8,50	10,00	12,50
Irak	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Israel	17,00	15,50	19,50	20,00	19,00
Jordania	20,00	17,00	20,00	27,00	30,00
Líbano	20,00	20,00	20,00	20,00	18,00
Libia	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Marruecos	100,00	122,00	129,00	132,00	120,00
Montenegro	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Siria	130,50	135,50	160,50	95,00	60,00
Túnez	30,00	35,00	40,00	30,00	50,00
Turquía	131,00	150,00	150,00	160,00	130,00
UE	1866,50	1790,00	1621,00	1717,00	1591,50
Uruguay	-	-	-	1,50	2,00
Arabia Saudí	15,00	16,00	21,00	22,00	22,00
Australia	44,00	40,00	37,00	44,00	37,00
Brasil	61,50	68,00	73,00	72,50	72,00

Canadá	40,00	39,50	37,00	40,50	37,50
Chile	10,00	13,00	6,00	5,50	6,00
China	29,50	40,00	39,00	32,00	30,00
Estados Unidos	275,00	300,00	287,00	301,50	290,00
Japón	35,50	43,00	51,00	54,00	51,00
Rusia	21,00	24,00	27,00	27,00	26,50
Total	2961,00	2971,00	2865,50	2907,50	2706,00

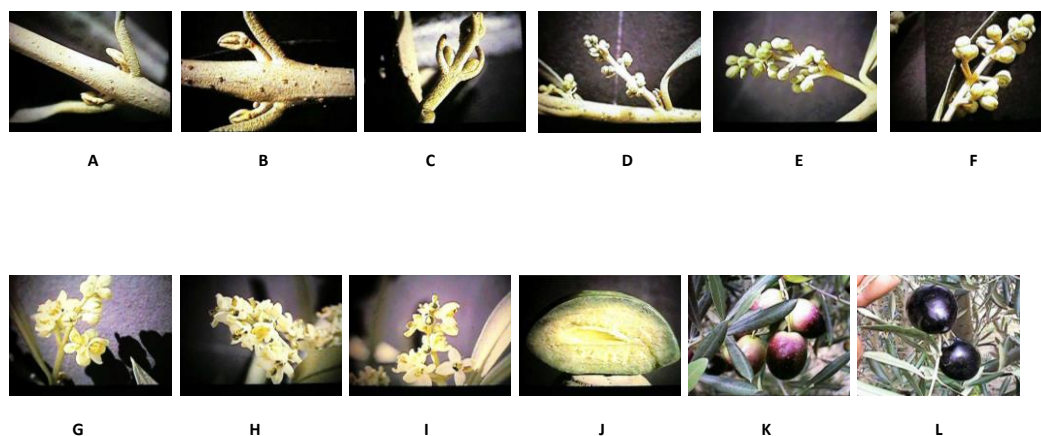
El ligero aumento observado en el consumo de aceite de oliva tanto en países productores como no productores puede explicarse en base a las cada vez más reconocidas propiedades nutricionales y organolépticas de este producto (Visioli et al., 2004). Además de su uso culinario, el aceite de oliva se emplea en preparaciones cosméticas y dermatológicas desde tiempos ancestrales. Aunque, sin duda, el aceite de oliva y la aceituna de mesa son los principales productos del olivo, en los últimos años se ha desarrollado una amplia línea de investigación centrada en el aprovechamiento de los subproductos del olivar (García-Maraver et al., 2012), como el uso del hueso como fuente de energía, del alpeorujó para la obtención de biomasa o la obtención de compuestos bioactivos a partir de la hoja de olivo (Boss et al., 2016).

El olivo (*Olea europaea* L.) pertenece a la familia botánica *Oleaceae*, en la que se engloban unos 29 géneros de plantas arbóreas y arbustivas distribuidas por las regiones tropicales y templadas del mundo. El olivo posee la interesante peculiaridad de ser el único miembro de la familia *Oleaceae* cuyo fruto es comestible. Se trata de un árbol de tamaño medio (Fig. 1), de unos 4 a 8 m de altura, según la variedad, con tronco grueso y copa redondeada, y que puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años (Uceda et al., 2000).



**Figura 1.** Forma y tamaño típico de un olivo

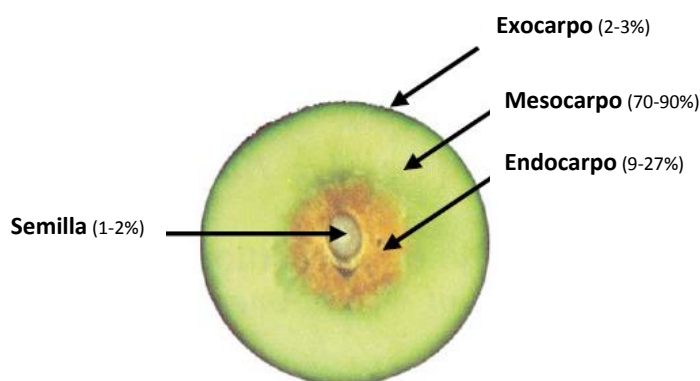
El olivo es un árbol polimórfico con fases juveniles y adultas. Las diferencias entre ambas fases se manifiestan en la capacidad reproductora (sólo en fase adulta), en el potencial para el enraizamiento (mayor en fase juvenil) y en diferencias morfológicas en hojas y ramas. Las hojas del olivo son opuestas y cruzadas, de brotes enteros y coloración verde oscura. Son persistentes y normalmente sobreviven dos o tres años, aunque también permanecen en el árbol hojas de mayor edad. La floración del olivo se produce en primavera. El desarrollo del fruto desde la floración hasta la completa maduración de la aceituna es un proceso largo que dura entre 35 y 40 semanas (Fig. 2). La lignificación del endocarpo se produce entre las 10 y las 12 semanas después de floración (SDF), y es en ese momento cuando se inicia la biosíntesis y acumulación de aceite, tanto en el mesocarpo como en la semilla (Rapoport, 2001). El proceso de maduración comienza aproximadamente a las 28 SDF y se caracteriza por un cambio de color del fruto que vira de verde a morado, hasta alcanzar un color prácticamente negro al final de la maduración (Sánchez, 1994). El proceso de desarrollo y maduración del fruto es el resultado de una combinación de sucesos bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar bajo un estricto control genético pero con influencia de factores medioambientales, edad del olivo o estado del árbol (Connor y Fereres, 2005).



**Figura 2. Estado fenológico de la aceituna** (Fuente: infolivo). Incluye las siguientes fases: **A.** Yema de invierno; **B.** Brotadura; **C.** Formación del racimo floral; **D.** Se forma y predomina la corola; **E.** La corola cambia de color; **F.** Se aprecian los estambres; **G.** Floración; **H.** Plena floración; **I.** Fruto cuajado; **J.** Endurecimiento del hueso; **K.** Envero; **L.** Maduración del fruto.

La aceituna es una drupa con una sola semilla (2-3% p/p) compuesta por tres tejidos principales: endocarpo o hueso (9-27% p/p), mesocarpo o pulpa (70-90%) y exocarpo o piel (1-2%) (Fig. 3). El conjunto de estos tejidos tiene su origen en la pared

del ovario, mientras que la semilla se encuentra en el interior del endocarpo y es de origen embrionario. El mesocarpo carnoso está compuesto por células parenquimáticas, y es el tejido donde se lleva a cabo la mayor acumulación de aceite. El componente mayoritario de la aceituna es el agua (50%), presentando un contenido de aceite en torno al 22%. En su composición hay también azúcares (19%), celulosa (6%), proteínas (1,6%) y elementos minerales (1,6%).



**Figura 3. Corte transversal de una aceituna**

El rendimiento de producción de un olivo se encuentra entre 15 y 50 kg de aceituna por árbol, dependiendo de las condiciones del cultivo y de la vecería natural de esta especie que hace que los rendimientos de producción varíen considerablemente de un año a otro.

El material vegetal del olivo cultivado en España está constituido por un gran número de variedades, todas ellas muy antiguas y cuya difusión está en muchos casos restringida en torno a su posible lugar de origen. Esta diversidad se debe probablemente al origen autóctono de las variedades, ocasionado porque en cada zona se eligieran para su multiplicación árboles con diferentes particularidades, y a determinados factores que han mantenido la situación inicial. En ese sentido, la homogeneidad genética entre las variedades cultivadas es muy acusada debido a los procedimientos de propagación vegetativa utilizados y a la muy baja ocurrencia y dificultad de detección de mutaciones en esta especie. De las variedades cultivadas en España, veinticuatro alcanzan la categoría de variedad principal. Entre ellas se encuentran variedades destinadas fundamentalmente a la elaboración de aceituna de mesa, como son Mazanilla de Sevilla y Gordal Sevillana. Otras tres, Hojiblanca, Manzanilla Cacereña y Aloreña, dedican

parte de su producción a aderezo y parte a la elaboración de aceite de oliva. El resto de las variedades se dedican casi con exclusividad a la elaboración de aceite de oliva, siendo Picual y Arbequina, con características sensoriales muy diferentes, las dos variedades de mayor repercusión económica en España.

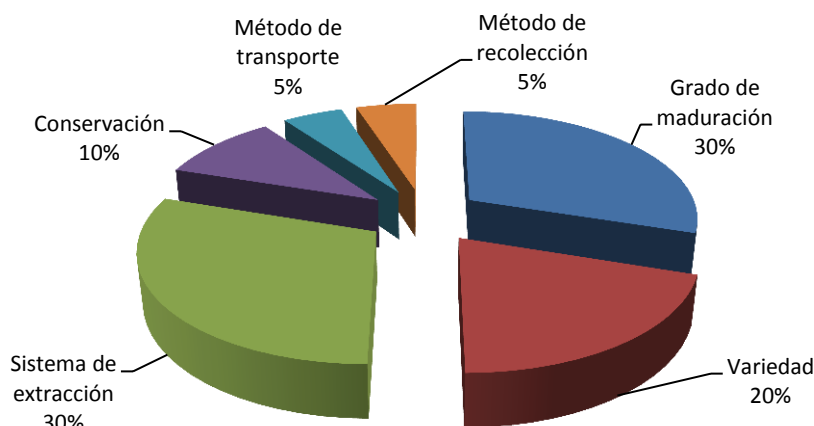
### **I.1.2. El aceite de oliva virgen**

El aceite de oliva virgen (AOV) se obtiene del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) únicamente por procedimientos mecánicos o por otros procedimientos físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que no hayan tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado, con exclusión expresa de cualquier mezcla de aceites obtenidos con disolventes, por procedimientos de reesterificación o por cualquier mezcla de aceites de otra naturaleza (Comité Oleícola Internacional). Por tanto, a diferencia del resto de aceites vegetales, el AOV puede ser consumido crudo, constituyendo un zumo natural que cuando se obtiene de frutos sanos da lugar a un producto de notables características nutricionales y organolépticas.

#### **I.1.2.1. Proceso de obtención del aceite de oliva virgen**

El proceso de elaboración del AOV comprende desde la recolección de la aceituna hasta la etapa de extracción de aceite. La recogida de la aceituna es una etapa importante ya que contribuye de forma significativa a la calidad y por tanto, al valor comercial del AOV. Para obtener un aceite de calidad el fruto debe ser cosechado en su grado óptimo de maduración (Aparicio y Morales, 1998), estar sano, ser recogido directamente del árbol y no del suelo, y ser llevado sin demora a la almazara para la elaboración del aceite. Una vez en la almazara se clasifica en función de la variedad, procedencia y estado sanitario.

La calidad del aceite de oliva virgen resulta influenciada por una serie de factores (Fig. 4) y circunstancias, entre los que se pueden citar como más importantes: variedad de olivo, clima, tipo de suelo, edad y sistemas de cultivo (Di Giovacchino et al., 2002).



**Figura 4. Factores condicionantes de las características cualitativas del aceite de oliva**

Es muy importante que el proceso de extracción del aceite se realice con la mayor rapidez posible ya que una espera excesiva de la aceituna almacenada puede llegar a desencadenar una serie de procesos fermentativos en el fruto (atrojado) que afecten negativamente a la calidad del aceite obtenido (Morales et al., 2005). Antes de ser procesadas, las aceitunas se hacen pasar por un sistema de limpieza donde se retiran restos, tanto vegetales como no vegetales, que puedan resultar perjudiciales para la maquinaria o interferir en la calidad del producto.

El proceso de elaboración del AOV se lleva a cabo en cuatro fases: molienda, batido, extracción y separación (Alba, 2001). El primer paso necesario para obtener el aceite de oliva virgen es la molturación de las aceitunas para destruir la estructura de los tejidos vegetales que la forman. Durante la molienda se produce la rotura de las membranas celulares permitiendo así la salida de las gotas de aceite. Es en esta etapa donde se ponen en contacto sustratos y enzimas implicadas en la formación de compuestos, determinantes de la calidad del AOV, como los compuestos volátiles. Los molinos utilizados pueden ser de rulos o empiedros, si luego se utiliza el sistema de prensas o molinos como el de martillo, de discos dentados o de rodillos metálicos, utilizados cuando posteriormente se emplea una centrífuga horizontal (decánter). Los molinos metálicos, tanto de martillo fijo como de discos, son más eficientes desde un punto de vista industrial ya que no son excesivamente grandes ni caros, trabajan

continuamente y tienen una alta capacidad por hora, que se traduce en un mayor rendimiento industrial.

Con el batido se completa el efecto de cizallamiento de la molienda y se facilita la coalescencia de las gotículas de aceite en gotas de mayor tamaño, lo cual facilita la posterior separación. Esta etapa se lleva a cabo en termobatidoras de eje horizontal, que son las más frecuentes, o de eje vertical. Se recomiendan tiempos cortos de batido de 20-30 min y temperaturas de batido de 22-25°C cuando la molienda se ha llevado a cabo con molinos de empiedro. Para evitar las emulsiones que puede provocar la molienda con molino de martillos se incrementa el tiempo (30-75 min) y la temperatura de batido (25-30°C).

La siguiente etapa es la extracción del aceite de la pasta batida. Se puede llevar a cabo por diferentes sistemas: filtración selectiva, extracción por presión y extracción por centrifugación de pasta, en dos o tres fases. La filtración selectiva o extracción parcial se basa en la distinta tensión superficial que existe entre el aceite y el agua de vegetación (alpechín). Este método no proporciona grandes rendimientos de aceite por lo que se combina con los métodos de presión o centrifugación. La extracción de aceite de oliva por el método de prensas es el procedimiento más antiguo de extracción de aceite, que se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo hasta llegar a las prensas hidráulicas actuales. Sin embargo, los sistemas más utilizados en la actualidad para la separación del aceite de las otras fases de la pasta de aceituna, tanto líquida (alpechín) como sólida (orujo), son los sistemas de centrifugación ya que se trata de procesos continuos que permiten obtener aceites de alta calidad con menores costes de producción. La centrifugación tiene lugar en una centrífuga horizontal que puede ser de dos fases (orujo húmedo o alperujo y aceite) o de tres fases (orujo, alpechín y aceite). En este último se adiciona a la pasta batida agua templada (25-35°C) para incrementar la fluidez y favorecer la separación de las fases sólidas y líquidas por la fuerza centrífuga. Esta adición presenta importantes inconvenientes como son el aumento del consumo de energía térmica, agua y de la cantidad de alpechín, además de dar lugar a un menor contenido de fenoles en el aceite obtenido. El sistema de dos fases resuelve o reduce drásticamente los inconvenientes de los decánteres de tres fases (Hermoso *et al.* 1995). El aceite obtenido con dicho sistema no presenta diferencias significativas en relación a los parámetros químicos y a la valoración organoléptica determinantes de la calidad del aceite comparado con el extraído en decánteres de tres fases. Sin embargo,

se produce un aumento del contenido total de polifenoles y, por ende, una mayor estabilidad oxidativa y una mayor intensidad del atributo amargo. El principal inconveniente de este método de extracción es la producción del subproducto alperujo que presenta humedades muy altas (60-70%) y es de difícil manejo. Independientemente del proceso usado para la extracción de aceite, es necesaria una centrifugación final para separar el aceite de pequeñas partículas sólidas y restos de agua mediante centrífugas verticales que alcanzan mayores velocidades (6000-7000 rpm). Una vez obtenido, el AOV debe ser almacenado en grandes depósitos evitando el uso de materiales inadecuados, el contacto prolongado con impurezas acuosas y la oxidación.

#### I.1.2.2. Clasificación del aceite de oliva

El aceite de oliva se clasifica en función de una serie de parámetros físico-químicos y organolépticos en diferentes categorías. Estas categorías vienen recogidas en el Reglamento de la Comisión de las Comunidades Europeas N° 2568/91 y en las correspondientes modificaciones posteriores, donde se definen las características químicas y organolépticas de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva, así como los métodos de evaluación de tales características. La última modificación (Reglamento de ejecución UE N° 1348/2013) recoge el método para la valoración organoléptica de los aceites de oliva vírgenes, en el que se incluye además una actualización de las descripciones de los atributos positivos y negativos de éstos e indicaciones para un etiquetado operativo. Las categorías de aceite de oliva son las siguientes:

- Aceite de oliva virgen extra: aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es inferior o igual a 0,8 g/100 g de aceite, siendo la mediana de sus defectos 0, y la del atributo afrutado superior a 0.
- Aceite de oliva virgen: aceite de oliva virgen con una acidez libre máxima de 2 g/100 g, siendo la mediana de sus defectos inferior o igual a 2,5, y la del atributo afrutado superior a 0.
- Aceite de oliva lampante: aceite de oliva virgen con una acidez libre superior a 2 g/100 g, siendo la mediana de sus defectos superior a 2,5, y la del atributo afrutado igual a 0.



La normativa en nuestro país no permite mezclar los aceites de oliva con ningún otro tipo de aceite ni grasa de origen vegetal ni animal. Los aceites de oliva deben presentarse a los consumidores envasados y etiquetados, identificándose claramente en el envase a cuál de las categorías aptas para el consumo pertenece el producto.

#### I.1.2.3. Composición del aceite de oliva virgen

El AOV está compuesto principalmente por triglicéridos (94-96%) y mezclas complejas de componentes menores (~ 2%) de naturaleza química muy diversa. Respecto a la composición de ácidos grasos, que en su mayor parte están formando parte de triglicéridos, la principal diferencia entre el AOV y otros aceites es su alto contenido en ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado que supone entre el 56 y 84% del contenido total de ácidos grasos, y la presencia de ácido linoleico, 3-21%, y ácido linolénico, 0,1-1,5%. Los restantes ácidos grasos mayoritarios son el ácido palmítico, 6-21%, el ácido palmitoleico, 0,3-3,5%, y el ácido esteárico, 0,3-5,3%. Los triglicéridos del AOV poseen una estructura específica en la que los ácidos grasos saturados se localizan principalmente en las posiciones 1, 3 y están prácticamente ausentes en la posición 2, que generalmente está ocupada por ácidos grasos insaturados. Además de triglicéridos, en el aceite de oliva también existen ácidos grasos libres, monoglicéridos y diglicéridos, pero en una proporción menor. Los diglicéridos (1-3%) pueden formarse por biosíntesis incompleta de los triglicéridos (1,2-diglicéridos) o por hidrólisis química o enzimática (1,3-diglicéridos). Los monoglicéridos están presentes en menor cantidad ( $\leq 0,25\%$ ) y los ácidos grasos libres provienen de los triglicéridos por reacciones hidrolíticas que pueden tener lugar en cualquier etapa del proceso de extracción del aceite. La cantidad de ácidos grasos libres presentes en un aceite determina su acidez y es uno de los parámetros básicos en la clasificación de calidad de los aceites de oliva.

Bajo la denominación de componentes menores se engloba un grupo muy amplio y heterogéneo de compuestos que constituyen en su mayor parte la fracción insaponificable del aceite y que pueden ser separados por el proceso de saponificación (Morales y León-Camacho, 2000). La gran diversidad existente entre los componentes menores del AOV es la base para la autentificación del mismo, permitiendo detectar mezclas fraudulentas (Aparicio et al., 2007). Cada uno de estos constituyentes está implicado en aspectos concretos de la calidad del aceite, influyendo en sus propiedades

nutricionales, tecnológicas y organolépticas (García-González et al., 2008; Mateos et al., 2003). Los principales componentes menores del AOV son los siguientes:

*Esteroles.*- Los esteroides se agrupan en tres clases, fitoesteroides, alcoholes triterpénicos y metilesteroides. En el AOV están presentes en el rango de 1800-5000 mg/kg (Mulinacci et al., 2005) y su contenido en el mismo puede usarse, además de criterio de pureza del aceite, para identificar el origen geográfico y la variedad de aceituna (Aparicio y Aparicio-Ruiz, 2000).

*Alcoholes alifáticos grasos.*- Los principales alcoholes lineales presentes en el aceite de oliva son docosanol, tetracosanol, hexacosanol y octacosanol mientras que los alcoholes con número impar de átomos de carbono se encuentran como trazas. El contenido total de alcoholes alifáticos no suele exceder de 350 mg/kg.

*Ésteres no-glicéridos.*- Como ya se ha indicado anteriormente, la mayor parte de los ácidos grasos presentes en el AOV se encuentran esterificados con el glicerol. Sin embargo, pequeñas cantidades de éstos forman ésteres con diferentes alcoholes como metanol, etanol y otros alcoholes de cadena larga, también con esteroides como  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol y con alcoholes triterpénicos. La concentración total de este grupo de compuestos se encuentra en el rango de 100-250 mg/kg.

*Hidrocarburos.*- El escualeno es el principal hidrocarburo presente en el AOV (1250-7500 mg/kg) y constituye alrededor del 50% de la fracción insaponificable. Otros hidrocarburos distintos al escualeno (pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano) se usan en la caracterización varietal y en el origen geográfico del aceite (Aparicio, 2000). El contenido total de hidrocarburos en el AOV se sitúa en el rango 1500-8000 mg/kg.

*Tocoferoles.*- En el AOV se detectan  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -tocoferol, siendo el  $\alpha$ -tocoferol el más abundante encontrándose en un rango de concentración de 12-400 mg/kg. Los tocoferoles contribuyen a las propiedades antioxidantes y nutricionales del AOV y su perfil se usa con frecuencia como criterio de pureza.

*Compuestos fenólicos.*- Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de especial interés dentro de los componentes menores del AOV ya que son en buena medida determinantes de las propiedades tanto nutricionales, como tecnológicas y organolépticas del AOV (Morales y Tsimidou, 2000). El perfil de compuestos fenólicos

del AOV está muy relacionado con el sabor amargo y picante, característico del aceite de oliva y, además, condiciona su estabilidad oxidativa (Luna et al., 2006a). El contenido de fenoles del aceite depende de la composición de polifenoles del fruto, que es característica de cada variedad, y del proceso de elaboración del AOV. Los principales compuestos fenólicos presentes en la aceituna son dos glucósidos, la oleuropeína y el ligustrósido, cuyas agluconas son ésteres del ácido elenólico con hidroxitirosol y tirosol, respectivamente. Durante el proceso de elaboración del AOV estos glucósidos fenólicos, por su carácter hidrosoluble, permanecen en la fase acuosa y no pasan al aceite. Sin embargo, durante la molienda y batido de la aceituna y por acción de glucosidasas y esterases presentes en la aceituna, estos compuestos pueden ser hidrolizados, transformándose en derivados fenólicos parcialmente solubles en el aceite. Los componentes mayoritarios de la fracción fenólica del AOV son los derivados secoiridoideos del hidroxitirosol y tirosol: formas aldehídicas de las agluconas de la oleuropeína y ligustrósido, además de las formas dialdehídicas de las agluconas de la oleuropeína descarboximetilada y del ligustrósido descarboximetilado. Además de esta fracción secoiridoidea mayoritaria existen fenoles simples como el hidroxitirosol, el tirosol, y en menor cantidad, los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, vanílico y cinámico, y los acetatos de hidroxitirosol y tirosol, así como compuestos a la familia de los lignanos y las flavonas.

*Pigmentos.*- Las clorofilas y los carotenoides son responsables del color del AOV. Los pigmentos clorofílicos son responsables del color verde del aceite, siendo las feofitinas, productos de oxidación de las clorofilas, los compuestos mayoritarios, mientras que los carotenoides son los que proporcionan la tonalidad amarillenta al aceite. La luteína es el carotenoide más abundante, seguido del  $\beta$ -caroteno y xantofilas. La cantidad de pigmentos en un aceite depende en gran medida de la variedad, grado de maduración de la aceituna, del sistema de elaboración del aceite y de las condiciones de almacenamiento del mismo. Los pigmentos clorofílicos se cuantifican en el AOV en concentraciones de 10-30 mg/kg mientras que la concentración de los carotenoides no excede de 10 mg/kg (Boskou, 2011). Estos compuestos juegan un papel importante en la salud, en la trazabilidad del alimento, en la autenticación y en la estabilidad oxidativa actuando como antioxidantes en condiciones de oscuridad y como prooxidantes en condiciones de luz.

*Ceras.-* Las ceras son ésteres de los ácidos grasos con alcoholes alifáticos de cadena larga y se utilizan como indicadores tanto de la calidad como de la pureza del AOV. Así, el AOV se distingue del refinado y del aceite de orujo porque contiene alto contenido de ceras de 36 y 38 átomos de carbono y bajo contenido de ceras de 40, 42, 44 y 46 átomos de carbono, mientras que los otros aceites se caracterizan por una relación inversa.

*Fosfolípidos.-* Los estudios de la composición de fosfolípidos presentes en el aceite de oliva son bastante escasos. Su contenido oscila en el rango de 40-135 mg/kg. Estos compuestos pueden afectar al estado fisicoquímico de aceites no filtrados y se consideran antioxidantes secundarios (Koidis y Boskou, 2006).

*Compuestos volátiles.-* Los compuestos volátiles responsables del aroma del AOV son componentes de naturaleza química muy diversa, aldehídos, cetonas, alcoholes y ésteres entre otros, que están presentes en el aceite en muy bajas concentraciones. Las características de estos compuestos se describen más detalladamente en el siguiente apartado.

## **I.2. EL FLAVOR DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN**

Como ya se ha comentado anteriormente, el AOV se clasifica en función de su calidad teniendo en cuenta parámetros físico-químicos (acidez, índice de peróxidos, absorbancia UV, entre otros) y organolépticos. En este último se evalúa el flavor del AOV, que se define como la combinación entre el sentido del gusto y del olfato junto con las sensaciones táctiles y quinesísticas producidas al emplazar un alimento en la boca.

El flavor único y delicado del AOV se atribuye principalmente a una mezcla compleja de compuestos volátiles que incluye fundamentalmente aldehídos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, furanos y ésteres, en combinación con otros compuestos no volátiles, principalmente compuestos fenólicos, responsables de las notas amargas y picantes del aceite de oliva.

La evaluación de la calidad sensorial de los aceites de oliva abarca la percepción tanto de atributos sensoriales favorables como no favorables, empleando los defectos

sensoriales como criterio para clasificar los aceites. Se consideran atributos positivos del AOV a los siguientes:

- Frutado. Conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedentes de frutos sanos y frescos, verdes o maduros y percibidos por vía directa o retronasal.
- Amargo. Es el sabor característico del aceite de oliva obtenido a partir de aceitunas verdes o en envero.
- Picante. Sensación táctil de picor, característica de los aceites obtenidos al comienzo de la campaña, principalmente de aceitunas todavía verdes.

La calidad sensorial del aceite puede estar modificada por la presencia de defectos, los más comunes son:

- Atrajado. Flavor característico del aceite obtenido de aceitunas amontonadas que han sufrido un avanzado grado de fermentación.
- Moho-humedad. Flavor característico del aceite de oliva obtenido a partir de aceitunas en las que se han desarrollado abundantes hongos y levaduras a causa de haber permanecido amontonadas con humedad varios días.
- Borrás. Se le atribuye a aceites de oliva que han permanecido en contacto con los lodos de decantación en depósitos.
- Avinado o avinagrado. También se debe al proceso de fermentación en las aceitunas, se producen compuestos tales como ácido acético, acetato de etilo y etanol.
- Metálico. Es característico de aceites que han permanecido en contacto, durante tiempo prolongado con superficies metálicas, durante los procesos de molienda, batido, separación o almacenamiento.
- Rancio. Aparece en aquellos aceites que han sufrido un proceso oxidativo. Los principales compuestos responsables de este flavor son aldehídos insaturados.

Sin duda uno de los aspectos más complejos en el estudio del flavor consiste en establecer la relación existente entre cada compuesto químico y los correspondientes atributos sensoriales. En el AOV se han aplicado varios métodos para establecer estas relaciones. La Tabla 2 recoge la descripción sensorial de los distintos compuestos volátiles presentes en la fracción volátil del AOV.

**Tabla 2. Valores umbrales y descriptores sensoriales de compuestos volátiles identificados en el aceite de oliva virgen.**

Compuestos volátiles	Umbral de olor (µg/kg de aceite)	Descriptor sensorial (aroma)	Referencia
<i>Aldehídos</i>			
Acetaldehído	0,22	Picante, dulce	(Reiners y Grosch, 1998)
3-Metil-butanal	5,4	Malta	(Reiners y Grosch, 1998)
2-Metil-butanal	5,2	Malta	(Reiners y Grosch, 1998)
Pentanal	240	Madera, amargo, aceitoso	(Morales et al., 2005)
(E)-Pent-2-enal	300	Verde, manzana	(Morales et al., 2005)
Hexanal	80	Manzana verde, hierba	(Morales et al., 2005)
(Z)-Hex-3-enal	3	Verde	(Aparicio y Luna, 2002)
(E)-Hex-2-enal	420	Almendras amargas, verde	(Morales et al., 2005)
Heptanal	500	Aceitoso, graso, madera	(Morales et al., 2005)
(E)-Hept-2-enal	5	Oxidado, seboso, picante	(Morales et al., 2005)
Hepta-2,4-dienal	3620	Graso, rancio	(Morales et al., 2005)
Octanal	320	Graso, áspero	(Morales et al., 2005)
(E)-Oct-2-enal	4	Herbáceo, picante	(Morales et al., 2005)
Nonanal	150	Graso, cera, picante	(Morales et al., 2005)
(E,E)-Nona-2,4-dienal	2500	Jabonoso, penetrante	(Morales et al., 2005)
(Z)-Non-2-enal	4,5	Verde, graso	(Reiners y Grosch, 1998)
(E)-Non-2-enal	900	Papel, graso	(Reiners y Grosch, 1998)
Decanal	650	Penetrante, dulce, ceras	(Morales et al., 2005)
(E)-Dec-2-enal	10	Pintura, pescado, graso	(Morales et al., 2005)
Deca-2,4-dienal	2150	Fuerte y graso	(Morales et al., 2005)
(E,E)-Deca-2,4-dienal	180	Pringoso	(Reiners y Grosch, 1998)
(E,Z)-Deca-2,4-dienal	10	Pringoso	(Reiners y Grosch, 1998)
4,5-Epoxi-(E)-Dec-2-enal	1,3	Metálico	(Reiners y Grosch, 1998)
<i>Alcoholes</i>			
Etanol	30.000	Alcohol	(Morales et al., 2005)

Butan-2-ol	150	Avinado	(Morales et al., 2005)
2-Metil-butan-1-ol	480	Avinado, picante	(Morales et al., 2005)
3-Metil-butan-1-ol	100	Madera, whisky, dulce	(Morales et al., 2005)
Pentanol	3000	Fuerte, pegajoso, balsámico	(Morales et al., 2005)
3-Penten-2-ol	400	Perfumado, madera	(Morales et al., 2005)
Hexanol	400	Fruta, plátano, suave	(Aparicio y Luna, 2002)
(E)-Hex-2-en-1-ol	5000	Hierbas verde, hojas	(Morales et al., 2005)
(E)-Hex-3-en-1-ol	1500	Verde	(Morales et al., 2005)
(Z)-Hex-3-en-1-ol	6000	Verde	(Morales et al., 2005)
Heptan-2-ol	10	Tierra	(Morales et al., 2005)
6-Metil-hept-5-en-3-ol	2000	Perfumado, nuez	(Morales et al., 2005)
Octan-2-ol	100	Tierra, graso	(Morales et al., 2005)
Oct-3-en-1-ol	1	Mohoso, tierra	(Morales et al., 2005)
Nonanol	280	Graso	(Morales et al., 2005)

*Ésteres*

Acetato de etilo	940	Pegajoso, dulce	(Morales et al., 2005)
Acetato de butilo	300	Verde, frutado, picante	(Morales et al., 2005)
Acetato de hexilo	1040	Verde, frutado, dulce	(Aparicio y Luna, 2002)
Acetato de (Z)-hex-3-en-1-ilo	750	Verde	(Aparicio y Luna, 2002)
Propanoato de etilo	100	Fruta, fuerte	(Morales et al., 2005)
Butanoato de etilo	30	Dulce, frutado	(Morales et al., 2005)
Isobutanoato de etilo	1,2	Frutado	(Reiners y Grosch, 1998)
Butanoato de propilo	150	Piña, punzante	(Morales et al., 2005)
Butanoato de 2-metil-propilo	100	Avinado, rancio-mohoso	(Morales et al., 2005)
2-Metil-butanoato de etilo	0,72	Frutado	(Reiners y Grosch, 1998)
3-Metil-butanoato de etilo	0,62	Frutado	(Reiners y Grosch, 1998)
Ciclohexil-carboxilato de etilo	0,16	Aromático y frutado	(Reiners y Grosch, 1998)

*Cetonas*

Butan-2-ona	40000	Éter y frutado	(Morales et al., 2005)
Pent-1-en-3-ona	0,73	Verde, picante	(Reiners y Grosch, 1998)

Heptan-2-ona	300	Dulce, frutado	(Morales et al., 2005)
6-Metil-hept-5-en-2-ona	1000	Picante, verde	(Morales et al., 2005)
Octan-2-ona	510	Moho, verde	(Morales et al., 2005)
Oct-1-en-3-ona	10	Champiñón, moho, picante	(Morales et al., 2005)
(Z,Z)-Octa-1,5-dien-3-ona	0,45	Geranio	(Reiners y Grosch, 1998)
(E)- $\beta$ -Damascenona	11	Manzana cocida	(Reiners y Grosch, 1998)

*Ácidos carboxílicos*

Ácido acético	500	Agrio, avinagrado	(Morales et al., 2005)
Ácido propaónico	720	Picante, agrio	(Morales et al., 2005)
Ácido butanoico	650	Rancio, queso	(Morales et al., 2005)
Ácido 3-metil-butanoico	22	Sudado	(Reiners y Grosch, 1998)
Ácido pentanoico	600	Desagradable, picante	(Morales et al., 2005)
Ácido hexanoico	700	Picante, rancio	(Morales et al., 2005)
Ácido octanoico	3000	Aceitoso, graso	(Morales et al., 2005)

*Otros compuestos*

Heptano	940	Dulce, alcano	(Morales et al., 2005)
4-metoxi-2-metil-butano-1-tiol	0,017	Grosella negra, gato	(Reiners y Grosch, 1998)
Guaiacol	16	Fenólico, quemado	(Reiners y Grosch, 1998)

El conocimiento de las distintas etapas en las que se forman los compuestos volátiles puede ser de gran ayuda para controlar la composición volátil del aceite de oliva virgen, permitiendo así producir aceites de oliva de mayor calidad, entendiendo ésta como el conjunto de atributos o características de un producto que determinan significativamente el grado de aceptabilidad de dicho producto por el consumidor. Por otra parte, el AOV es susceptible de sufrir tanto de reacciones hidrolíticas como oxidativas que podrían afectar negativamente a la calidad del mismo. En el periodo de tiempo que transcurre entre la extracción del aceite y su consumo, se producen modificaciones como el incremento en el índice de peróxidos o el desarrollo o pérdida



de ciertos compuestos volátiles. Por tanto, la presencia o ausencia de ciertos compuestos volátiles puede ser un buen indicador de cambios en la calidad el aceite de oliva.

### **I.3. LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN**

Los compuestos volátiles son compuestos de bajo peso molecular (menos de 300 Da), que se evaporan rápidamente a temperatura ambiente. Algunos de estos compuestos volátiles alcanzan el epitelio olfativo, se disuelven dentro de la mucosidad y pueden unirse a receptores olfativos para dar lugar a la sensación de olor.

Los compuestos volátiles mayoritarios del AOV, tanto desde un punto de vista cualitativo como cuantitativo, son los compuestos volátiles de 5 (C5) y 6 (C6) átomos de carbono. La variedad cultivada, la región geográfica, el estado de maduración del fruto y los métodos de procesamiento del aceite de oliva influyen en la composición de compuestos volátiles del mismo (Kalua et al., 2007).

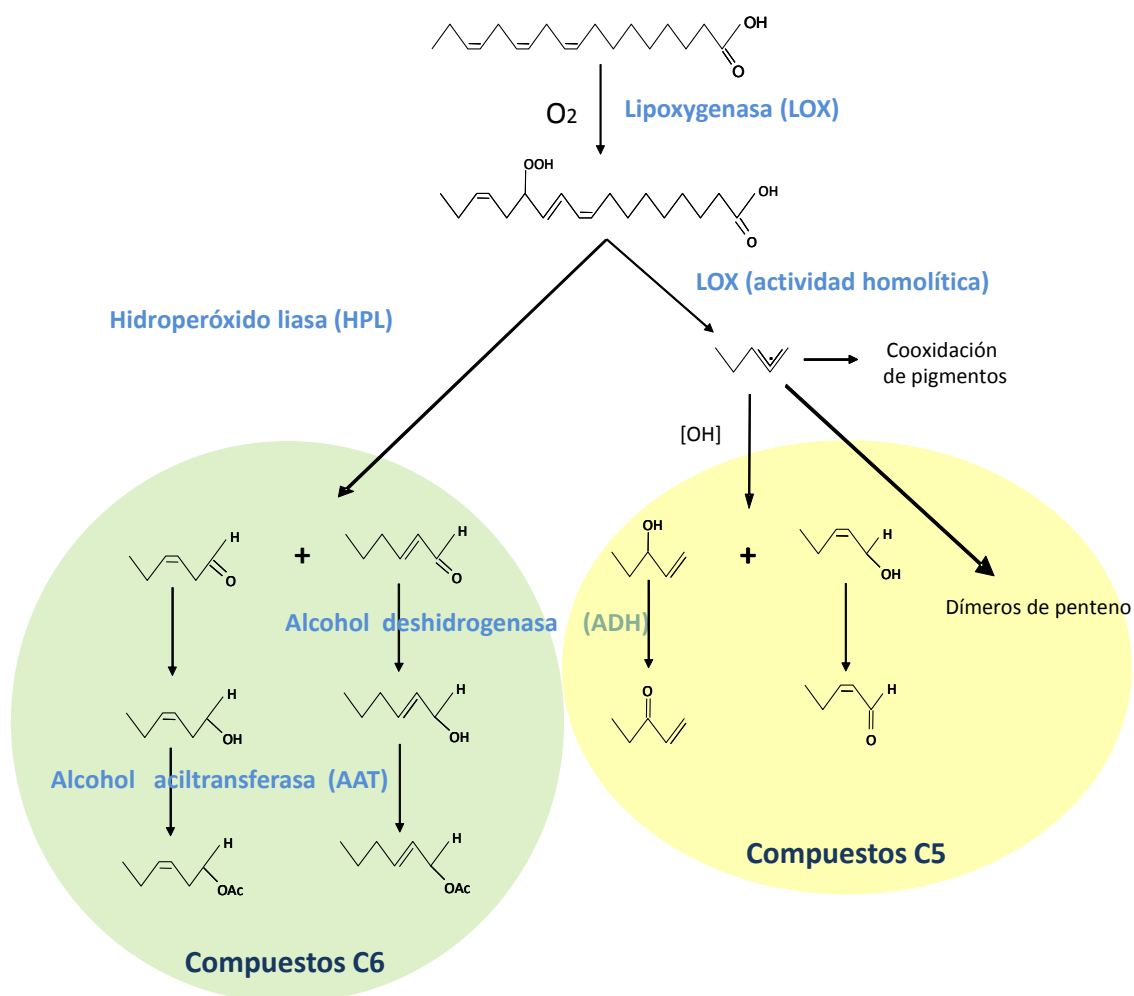
#### **I.3.1. Biogénesis de los compuestos volátiles**

Las plantas tienen la capacidad de producir una gran diversidad de compuestos volátiles, estos compuestos tienen varias funciones fisiológicas, entre las cuales se encuentran ayudar en la polinización, actuando como atrayentes de los polinizadores favoreciendo así la dispersión de semillas, y como señalización contra la patogénesis (Aragüez y Valpuesta, 2013).

Durante el proceso de maduración del fruto se producen una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos (Schreier, 1985) como los que ocurren en la composición lipídica intracelular, siendo la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados una de las modificaciones más importantes de esta etapa. Esta puede ocurrir tanto por oxidación química como por la acción de enzimas como la lipoxigenasa (LOX) o la  $\alpha$ -dioxigenasa. El metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados a través de la ruta cuya etapa inicial cataliza la LOX y las sucesivas reacciones enzimáticas que se producen a continuación se denomina colectivamente como ruta de la LOX, y los metabolitos a los que da lugar, que poseen funciones fisiológicas muy relevantes, se conocen globalmente como oxilipinas. Existen diferentes ramas de la ruta de la LOX en función de la forma

en que el hidroperóxido del ácido graso es metabolizado (Feussner y Wasternack, 2002). Las principales ramas metabólicas de la ruta LOX están operadas por diferentes enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450 como la óxido de aleno sintasa (AOS), la peroxigenasa (POX), la divinil éter sintasa (DES) y la hidroperóxido liasa (HPL). Los óxidos de aleno generados por la AOS son hidrolizados a  $\alpha$ - y  $\gamma$ -cetoles o ciclados y posteriormente convertidos, a través de varias etapas enzimáticas, en ácido jasmónico, hormona vegetal de amplia relevancia fisiológica (Vick y Zimmerman, 1986). La acción de la POX sobre los hidroperóxidos da lugar a la formación de hidroxí, epoxi y epoxi-hidroxí derivados de ácidos grasos que a través de la actuación de diferentes actividades hidrolasas se convierten en di- y trihidroxí derivados de ácidos grasos (Blée, 1996). Por otra parte, la DES es la responsable de la síntesis de los ácidos colneleico y colnelénico a partir de los 9-hidroperóxidos sintetizados por la LOX (Grechkin et al., 1995). Por último, la HPL rompe el enlace C-C adyacente al grupo hidroperóxido dando lugar a la formación de  $\omega$ -oxoácidos y aldehídos volátiles (Matsui, 2006).

Esta rama de la ruta LOX catalizada por la HPL, que actúa fundamentalmente en los procesos que implican una ruptura de la integridad celular, es la responsable de la biosíntesis de los principales compuestos volátiles que se encuentra en el AOV. Como consecuencia de la molienda de las aceitunas para extraer su aceite, se produce una destrucción de la integridad tisular y celular, poniéndose en contacto enzimas y sustratos antes separados en distintos compartimentos celulares. Así, la ruta LOX transcurre a través de la acción de una serie de actividades enzimáticas que peroxidan (LOX) y escinden (HPL) ácidos grasos poliinsaturados como los ácidos linoleico (LA) y linolénico (LnA) para producir aldehídos de seis átomos de carbono (C6) que posteriormente son reducidos a alcoholes (alcohol deshidrogenasa, ADH) y finalmente esterificados con acil-coenzima A para formar ésteres (alcohol aciltransferasa, AAT) (Olías et al., 1993). En la Figura 5 se muestra la formación de compuestos volátiles C6 a partir del LnA que componen mayoritariamente el perfil volátil del AOV y son los principales responsables de su aroma. Se recoge, además, una reacción adicional catalizada, probablemente, también por la LOX que genera compuestos volátiles de cinco átomos de carbono (compuestos C5). Angerosa et al. (2000) demostraron la relevancia sensorial de los compuestos C5 en el aroma del AOV.



**Figura 5.** Ruta de biosíntesis de compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen a partir de ácido linolénico.

Estos compuestos parecen ser sintetizados a través de una rama adicional de la ruta de la LOX que implicaría la formación de un radical 13-alcoxilo mediado por una actividad LOX como se ha descrito en soja (Salch et al., 1995; Gardner et al., 1996). Como ocurre en los procesos de autooxidación lipídica, este radical alcoxilo sufriría una  $\beta$ -escisión homolítica no enzimática, para formar radicales alílicos 1,3-penteno que pueden dimerizarse para formar dímeros de penteno o reaccionar con radicales hidroxilo para formar alcoholes C5. Estos últimos serían el origen de los carbonilos C5 que se encuentran en el aroma del AOV, formándose a través de la oxidación enzimática mediada por la actividad ADH como se ha sugerido que ocurre en hoja de soja (Fisher et al., 2003). En relación a esta rama homolítica, aún no completamente caracterizada, los estudios realizados con plantas transformadas de tomate con bajos niveles de actividad HPL, obtenidas mediante la técnica antisentido, apoyan la implicación directa

de LOX en la formación de C5 ya que la ausencia de actividad HPL en estas plantas produce un incremento en el contenido de hidroperóxidos en los tejidos y la síntesis de compuestos C5, con el consiguiente descenso del nivel de compuestos C6 (Vancanneyt et al., 2001).

El aspecto bioquímico de la formación de compuestos volátiles del AOV a través de la ruta LOX ha sido estudiado por varios grupos de investigación (Olías et al., 1993; Salas et al., 1999; Pérez et al., 2003; Luaces et al., 2006). En este sentido, el principal avance en la investigación sobre los compuestos volátiles que determinan el aroma del AOV proviene del uso de las técnicas moleculares. Recientemente se han descrito una serie de genes que intervienen en la síntesis de estos compuestos volátiles. El estudio de las características cinéticas de las enzimas que codifican ha proporcionado nueva información sobre los factores que regulan la emisión de los compuestos volátiles (Padilla et al., 2009, 2010). En torno al 95% de los ácidos grasos contenidos en la aceituna madura se encuentran esterificados en forma de triglicéridos. Los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en una proporción en el rango 5-20% y entre ellos destacan LA y LnA, que son los principales sustratos de la ruta de la LOX para la síntesis de la fracción volátil del AOV. Además, la aceituna contiene un 2% de glicolípidos de membrana, que también son ricos en ácidos grasos poliinsaturados, principalmente en LnA. Se ha sugerido la presencia de actividades lipasas y fosfolipasas en el mesocarpo y semilla de la aceituna (Pinsky et al., 1971; Olías et al., 1993), Panzanaro et al. (2010) caracterizaron una lipasa asociada a gotas lipídicas de células del mesocarpo, confirmando así que la aceituna posee toda la maquinaria enzimática necesaria para suministrar sustratos a la ruta de la LOX.

I.3.1.1. Oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. La reacción de la lipoxigenasa

La LOX (linoleato:oxígeno oxidoreductasa, EC 1.13.11.12) es una dioxigenasa que contiene hierro no hemínico y que cataliza la dioxigenación de la estructura 1,4-pentadieno de ácidos grasos poliinsaturados, tales como ácido linoleico (LA), linolénico (LnA) o ácido araquidónico, para producir sus correspondientes hidroperóxidos. De hecho, está implicada en la biosíntesis de numerosas moléculas involucradas en la

respuesta vegetal al estrés y al daño, tales como traumatina y ácido jasmónico y (Salas et al., 1999).

La dioxigenación mediada por la LOX sobre los ácidos grasos libres puede ocurrir en el átomo de carbono en posición 9 (9-LOX) ó 13 (13-LOX) dando lugar a los correspondientes derivados 9-hidroperóxidos y 13-hidroperóxidos, respectivamente. Diferentes resultados experimentales sugieren que, además de ácidos grasos libres, algunas LOXs de plantas y animales son capaces de hidroperoxidar también ácidos grasos esterificados en fosfolípidos (Brash et al., 1987) y triacilglicéridos (Feussner et al., 1997; Holtman et al., 1997).

Las LOXs de plantas son ubicuas y están codificadas por familias multigénicas. En base a la comparación de la estructura primaria, las LOXs de plantas se clasifican en dos subfamilias génicas, LOXs de tipo 1 y LOXs de tipo 2. Las LOXs de tipo 1, generalmente, son citosólicas y la mayoría producen derivados 9-hidroperóxidos a partir de los ácidos grasos poliinsaturados, excepto las de leguminosas que producen derivados 13-hidroperóxidos. Las LOXs de tipo 2 son proteínas cloroplásticas, mostrando un péptido de tránsito N-terminal y produciendo principalmente derivados 13-hidroperóxidos a partir de ácidos grasos poliinsaturados. La expresión de LOX en plantas está regulada por el desarrollo y en respuesta a estrés. Las diferentes isoformas de LOX parecen tener diferentes funciones fisiológicas, concernientes principalmente a la producción de señales involucradas en la regulación del crecimiento de la planta y en la producción de compuestos que pueden actuar como mecanismo de defensa frente al ataque de herbívoros y/o patógenos.

La biosíntesis de los compuestos volátiles del AOV parece depender principalmente de la disponibilidad de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente LnA (A Sánchez-Ortiz et al., 2007), y la actividad enzimática LOX durante el proceso industrial de extracción del aceite (Sánchez-Ortiz et al., 2012b). Dicha actividad es baja en aceituna, lo cual impide estudiar y caracterizar con detalle las distintas isoformas de LOX. Las pocas evidencias bioquímicas disponibles se limitan a ratificar la preferente formación de derivados 9-hidroperóxido sobre los 13-hidroperóxido (Olías et al., 1993; Salas et al., 1999) y la presencia fundamentalmente de dos isoformas activas en extractos crudos (Luaces et al., 2007b). En este sentido, se han aislado cuatro genes lipoxigenasa de olivo y se han caracterizado catalíticamente las proteínas que codifican:

*Oe1LOX1* (Palmieri-Thiers et al., 2009), *Oep2LOX1* (Padilla et al., 2012), y *Oep1LOX2* y *Oep2LOX2* (Padilla et al., 2009). Sólo dos de estos genes codifican proteínas con actividad 13-LOX estricta (*Oep1LOX2* y *Oep2LOX2*). Los datos bioquímicos y de expresión génica durante el proceso de maduración del fruto sugieren que el gen *Oep2LOX2* es el principal responsable de la síntesis de compuestos volátiles del AOV (Padilla et al., 2009).

I.3.1.2. Escisión de hidroperóxidos de ácidos grasos. La reacción catalizada por la hidroperóxido liasa

La HPL cataliza la escisión del enlace C-C del hidroperóxido de ácido graso, producido previamente por acción de la LOX, dando lugar a la formación de aldehídos y oxoácidos. Esta enzima genera aldehídos de 6 átomos de carbono y  $\omega$ -oxoácidos de 12 átomos de carbono cuando el sustrato que utiliza es un 13-hidroperóxido, y cuando el sustrato es un 9-hidroperóxido origina aldehídos y  $\omega$ -oxoácidos de 9 átomos de carbono (Salas y Sánchez, 1999).

La HPL es una proteína homotrimérica, asociada a membrana, con un dominio hemínico. Pertenece a una rama de la familia del citocromo P450 (CYP74) que, a diferencia de las demás citocromo P450, no requiere oxígeno molecular o NAD(P)H como cofactor, sino que utilizan hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados como sustrato y donador de oxígeno (Salas y Sánchez, 1999). Su papel fisiológico es producir, en respuesta al daño, compuestos volátiles a partir de 13-hidroperóxido y también el precursor de la hormona traumatina (ácido 12-oxo-10(*E*)-dodecenoico). Entre los compuestos volátiles, los aldehídos son los compuestos con mayor relevancia en el aroma de frutos y flores. Presentan actividad antimicrobiana, por lo que están involucrados en la respuesta frente al ataque por patógenos. Como antes se ha comentado, los aldehídos de 6 átomos de carbono son cuantitativa y cualitativamente los componentes más importantes del aroma del AOV.

Se han descrito tres tipos principales de HPL, en función a su especificidad de sustrato: 13-HPL, que actúan estrictamente sobre 13-hidroperóxidos de ácidos grasos; las 9/13-HPL, que actúan tanto sobre 9-hidroperóxidos como sobre 13-hidroperóxidos de ácidos grasos; y las 9-HPL que son específicamente activas sobre 9-hidroperóxidos.

En olivo se ha descrito la existencia de un único gen correspondiente a una 13-HPL (Padilla et al., 2010).

El mayor nivel de actividad HPL lo encontramos en frutos verdes, al inicio de la maduración. A medida que avanza la maduración se observa un ligero descenso, pero manteniéndose siempre un alto nivel de actividad a lo largo del proceso madurativo (Kalua et al., 2007).

#### I.3.1.3. Formación de alcoholes volátiles. La reacción de la alcohol deshidrogenasa

Los aldehídos volátiles formados por el sistema enzimático LOX/HPL pueden ser reducidos por la acción de la enzima ADH que cataliza la reacción reversible, dependiente de piridín nucleótidos, de aldehídos a sus correspondientes alcoholes. La ADH es una metaloproteína que posee un grupo sulfhidrilo en su sitio activo y dos subunidades idénticas con un peso molecular de 45 kDa, que ha sido caracterizada en diferentes frutos (Pérez y Sanz, 2008; Chervin et al., 1999; Iaria et al., 2012). Se ha observado que en aceituna la actividad enzimática ADH se sitúa principalmente en el mesocarpio, presentando mayor afinidad por sustratos de C6 insaturados (Olías et al., 1993). Posteriormente, se detectaron dos tipos de proteínas con actividad ADH en mesocarpio de aceituna, una ADH dependiente de NADH y otra dependiente de NADPH (Salas y Sánchez, 1998). La actividad ADH dependiente de NADPH es la mayoritaria en el mesocarpio de aceituna, lo que la convierte en la principal responsable de la síntesis de los alcoholes presentes en la fracción volátil del AOV. Trabajos previos han detectado un nivel de actividad ADH importante en semilla (Luaces et al., 2003), con características similares respecto a la afinidad por sustratos C6 aldehídos, pero con una mayor estabilidad térmica. En las condiciones térmicas habituales de extracción de AOV, a pesar del inferior aporte de carga enzimática (menor del 7 %) respecto de la pulpa, su contribución a la síntesis de compuestos volátiles del AOV podría ser comparativamente superior.

#### I.3.1.4. Formación de ésteres. La reacción de la alcohol aciltransferasa

Los alcoholes producidos por acción de la enzima ADH, pueden formar ésteres volátiles. La AAT cataliza la formación de ésteres a partir de diferentes acil-CoAs. La AAT pertenece a una familia de aciltransferasas llamada BAHD (St-Pierre y De Luca, 2000). En los últimos años se han aislado y caracterizado numerosos genes que codifican AATs en plantas tales como fresa (Aharoni et al., 2000), plátano (Beekwilder et al., 2004), melón (El-Sharkawy et al., 2005; Yahyaoui et al., 2002), *Arabidopsis* (D'Auria et al., 2003), melocotón (Sánchez et al., 2013), manzana (Souleyre et al., 2014) y algodón (Chedgy, 2015). Estos resultados junto con los estudios previos realizados con extractos de diferentes frutos (Holland et al., 2005; Olías et al., 1995; Ueda et al., 1992) han puesto de manifiesto la amplia especificidad de sustrato de las AATs de fruto tanto para los alcoholes como para los acil-CoAs. Aunque todas ellas pertenecen a la familia BAHD, las proteínas AATs de diferentes especies de frutos presentan una gran divergencia. El bajo nivel de homología presente en sus secuencias es una de las razones por las que no se ha conseguido aún clonar ningún gen AAT de olivo. Sin embargo, a partir de la medida de los niveles de actividad enzimática AAT, se ha comprobado que la semilla es una fuente muy importante de actividad AAT (Luaces et al., 2003), y se ha observado que esta actividad presenta una mayor afinidad por hexanol y (*Z*)-hex-3-enol que por (*E*)-hex-2-enol.





## **II. Objetivos**



## II. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de investigación es la identificación y caracterización de genes y enzimas de la ruta de la LOX responsables del aroma del AOV. Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Aislamiento, secuenciación y análisis de expresión de nuevos genes *LOX* de olivo.
- Caracterización de la variabilidad del olivo en relación con la fracción volátil del AOV.
- Caracterización metabólica, bioquímica y molecular de la biosíntesis de los compuestos volátiles del aceite en variedades de olivo seleccionadas.
- Caracterización metabólica, bioquímica y molecular de la biosíntesis de los compuestos volátiles del aceite en individuos seleccionados de un cruzamiento Picual x Arbequina.
- Caracterización funcional de la 13-hidroperóxido liasa de olivo en la biosíntesis de compuestos volátiles del aceite de oliva.



### **III. Materiales y Métodos**



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **III.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

##### **III.1.1. Olivo**

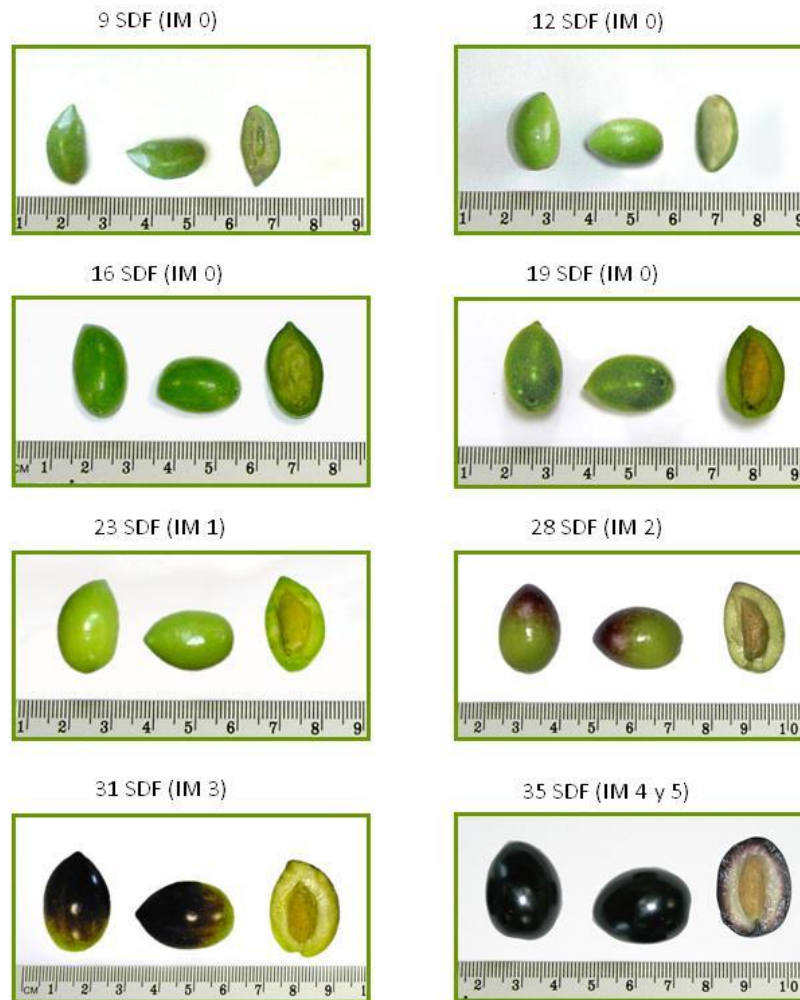
###### **III.1.1.1. Variedades y condiciones de cultivo**

Para el desarrollo de los experimentos presentados en este trabajo se han utilizado olivos (*Olea europaea* L.) de las variedades Picual y Arbequina cultivados en el olivar experimental del Instituto de la Grasa en Sevilla y variedades procedentes de la colección nuclear (CN-36) del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo (Belaj et al., 2012), cultivadas en el olivar experimental del centro IFAPA Alameda del Obispo en Córdoba.

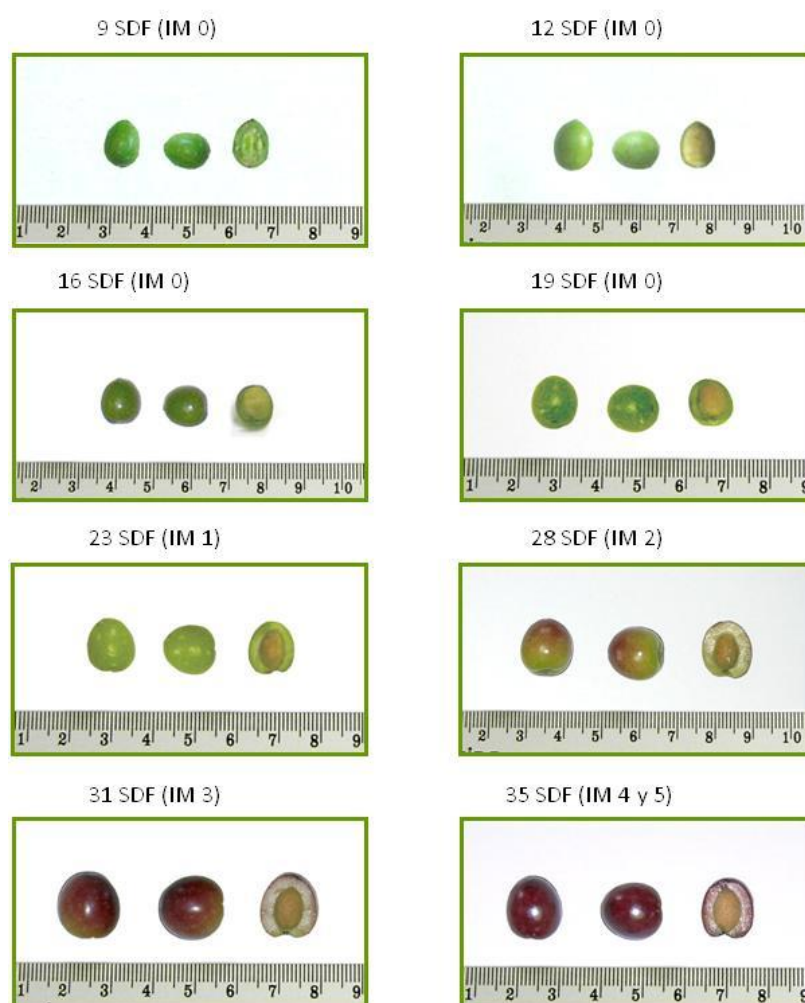
Los olivares utilizados presentan un marco real de plantación (12 m x 12 m) y un régimen de regadío con fertirrigación por goteo desde el momento de la floración hasta la maduración completa del fruto (abril-enero), excepto aquellos árboles destinados a los experimentos de secano.

Para los experimentos de estreses abióticos, se recogieron ramas de olivo de las variedades Picual y Arbequina que contenían aproximadamente 100 frutos en enero con 28 SDF (semanas después de la floración), y se incubaron durante 24 h en una cámara de cultivo a 25 °C con una intensidad de luz de 11,5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un ciclo de 12 h luz/12 h de oscuridad, de tal manera que el inicio del experimento se producía a las 2 h del ciclo de luz, manteniéndose el fotoperiodo natural día/noche de las aceitunas. De esta forma, las condiciones fisiológicas se mantenían lo más parecidas posibles a las del árbol, no detectándose cambios en la expresión del gen *Oe3LOX2*. Los tratamientos de estrés se basaron en la modificación de las condiciones estándar según el efecto estudiado.

La toma de muestras se realizó recolectando frutos de todo el árbol al azar en el estadio de maduración seleccionado para cada tipo de ensayo.



**Figura 6. Aspecto y estadios de desarrollo y maduración de las aceitunas de la variedad Picual utilizadas en este trabajo. La regla mostrada mide el tamaño de los frutos en cm.**



**Figura 7. Aspecto y estadios de desarrollo y maduración de las aceitunas de la variedad Arbequina utilizadas en este trabajo.** La regla mostrada mide el tamaño de los frutos en cm.

### III.1.1.2. Tejidos utilizados

Los tejidos de olivo empleados en este trabajo han sido: tejido foliar procedente de hojas jóvenes, tejido indiferenciado de frutos completos en los que no se había formado aún el endocarpo (drupa joven) y tejidos de mesocarpo y semilla obtenidos a partir de frutos con distintos estadios de desarrollo y maduración. Los tejidos destinados a la extracción de RNA se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los frutos destinados a la extracción de aceite o a la obtención de extractos crudos se utilizaron inmediatamente después de su recolección, conservándose a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante el tiempo transcurrido entre recogida y procesado. Los frutos destinados a la elaboración de polvo acetónico se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.



Para el seguimiento del desarrollo y la maduración de los frutos de las distintas variedades se recogieron muestras cada tres o cuatro semanas, tomando sólo el estadio mayoritario de los árboles a los tiempos indicados. La edad de la aceituna se determinó en semanas después de floración (SDF) (Fig. 6 y 7), relacionándose con el índice de maduración (IM) determinado en función del color de la piel y el mesocarpio de la aceituna de acuerdo con Hermoso et al. (1991):

- IM 0, aceitunas con epidermis verde intenso.
- IM 1, aceitunas con epidermis amarilla o verde amarillento.
- IM 2, aceitunas con epidermis amarillenta y puntos o áreas rojizas.
- IM 3, aceitunas con epidermis rojiza o violeta claro.
- IM 4, aceitunas con epidermis negra y mesocarpio completamente blanco.
- IM 5, aceitunas con epidermis negra y aproximadamente la mitad del mesocarpio violeta.
- IM 6, aceitunas con epidermis negra y mesocarpio violeta casi en su totalidad.
- IM 7, aceitunas con epidermis negra y mesocarpio completamente negro.

A las 9 SDF (IM 0) aún no ha tenido lugar la lignificación del endocarpio, fenómeno que suele producirse entre las 10 y las 12 SDF, y que coincide con el inicio de la síntesis y la acumulación del aceite tanto en el mesocarpio como en la semilla. Tras un largo proceso de desarrollo, el color verde intenso cambia a verde amarillento aproximadamente a las 23 SDF (IM 1). Sobre las 28 SDF comienza el proceso de maduración del fruto (IM 2), cambiando el color a morado alrededor de las 31 SDF (IM 3) y finalmente a negro aproximadamente a las 35 SDF (IM 4 y 5).

Finalmente, se establecieron cuatro estadios de maduración para los diferentes estudios correspondientes a: I, IM=0 (fruto verde); II, IM=1 (fruto verde-amarillo); III, IM=2,5 (envero); IV, IM=5 (fruto maduro).

### **III.1.2. *Escherichia coli***

#### **III.1.2.1. Estirpes empleadas**

Las estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo y sus genotipos correspondientes se describen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyr96 thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]
XL10-Gold Kan	Tet <sup>r</sup> Δ( <i>mrcA</i> )183 Δ( <i>mrcCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ) Tn5 (Kan <sup>r</sup> ) <i>amy</i> ]

### III.1.2.2. Condiciones de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *E. coli* tras ser esterilizados en autoclave, fueron los siguientes:

- Medio Luria-Bertani (LB): Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v) y NaCl 1% (p/v).
- Medio NZY<sup>+</sup>: Hidrolizado de caseína 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), MgCl<sub>2</sub> 12,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 12,5 mM, glucosa 0,4% (p/v).
- Medio SOC: Triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 0,05% (p/v), KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glucosa 0,36% (p/v).
- Medio SOB: Triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 0,05% (p/v), KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

Para preparar medios de cultivo sólidos se añadió agar bacteriológico 1,5% (p/v).

Las disoluciones concentradas de antibióticos para la selección de cepas resistentes se esterilizaron por filtración y se añadieron al medio de cultivo después del autoclavado a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (100 μg ml<sup>-1</sup>), tetraciclina (50 μg ml<sup>-1</sup>) y kanamicina (50 μg ml<sup>-1</sup>).

El crecimiento de los cultivos bacterianos se llevó a cabo a 37 °C. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri, mientras que los de medio líquido se incubaron con agitación orbital a 200 rpm.

## **III.2. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA**

### **III.2.1. Transformación genética de *E. coli***

Para la preparación de células competentes de la cepa de *E. coli* XL1-Blue se inoculó a partir de una colonia aislada un precultivo de 2 ml de medio LB con tetraciclina y se incubó durante toda la noche. Con 1 ml del precultivo se inocularon 100 ml de medio SOB y se cultivó hasta alcanzar aproximadamente una  $A_{660} = 0,5$ . A continuación, se incubó el cultivo en hielo durante 10 min y se recogieron las células por centrifugación a 2.500 g durante 10 min a 4 °C. Tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado de células en 40 ml de tampón TB [ácido 1,4-piperazindietanesulfónico (PIPES)-KOH 10 mM,  $MnCl_2$  55 mM,  $CaCl_2$  15 mM, KCl 250 mM] estéril y preenfriado a 4 °C. Posteriormente, se incubó en hielo durante 10 min, se centrifugó a 2.500 g durante 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de células en 8 ml de tampón TB preenfriado a 4 °C y 0,56 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Tras incubar 10 min en hielo, las células competentes se dividieron en alícuotas de 200  $\mu$ l, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso. Las células así preparadas presentaron una eficiencia de transformación de  $10^6$ - $10^7$  transformantes por  $\mu$ g de DNA.

La transformación de las células competentes XL1-Blue se realizó añadiendo DNA transformante (<100 ng en un máximo de 20  $\mu$ l) a una alícuota de 200  $\mu$ l de células competentes recién descongelada y se incubó 20 min en hielo. A continuación, las células fueron sometidas a choque térmico durante 90 s a 42 °C y se incubaron en hielo durante 2 min, posteriormente se añadieron 800  $\mu$ l de medio LB y se incubó a 37 °C durante 45 min, con agitación orbital a 150 rpm. Las células transformadas se centrifugaron a 1.100 g durante 5 min y se resuspendió el precipitado en 100  $\mu$ l de medio LB para sembrar las células en medio LB sólido con el antibiótico adecuado.

Para las construcciones preparadas con el plásmido pSPARK® I se emplearon células competentes XL10-Gold *Kan* (Stratagene) de eficiencia de transformación superior a  $5 \times 10^9$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **III.2.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli***

El aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* a pequeña escala se realizó con el “GFX™ Micro Plasmid Prep Kit” (GE Healthcare, Reino Unido). Para ello, se inocularon 3 ml de medio LB con el antibiótico adecuado a partir de una colonia transformada aislada y se creció el cultivo durante toda la noche. Tras recoger las células por centrifugación a 16.000 g durante 30 s, el aislamiento del DNA plasmídico se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **III.2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

La electroforesis de DNA se llevó a cabo según Sambrook et al. (1989), utilizando geles de agarosa 0,7-1,7% (p/v) y preparados en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1 mM).

Las muestras se suplementaron con tampón de carga que contenía azul de bromofenol 0,09% (p/v), xilen cianol FF 0,09% (p/v), glicerol 60% (v/v) y EDTA 60 mM, y la electroforesis se desarrolló en cubetas horizontales, usando TAE como tampón de electroforesis.

Para la detección del DNA, tanto los geles como el tampón de electroforesis incluían RedSafe al 0,1% (p/v), visualizándose las bandas en un transiluminador de luz ultravioleta.

Para determinar el tamaño de los fragmentos separados se empleó el marcador de peso molecular “1 Kb Gene Ruler™” (Thermo Scientific, Estados Unidos. Para la cuantificación de los fragmentos de cDNA se utilizó el marcador “Mass Ruler™” (Thermo Scientific).

#### **III.2.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

Después de su identificación mediante visualización con luz ultravioleta, se cortó el fragmento de gel que contenía la banda deseada con una cuchilla estéril. La extracción del DNA se llevó a cabo usando el kit “QIAEX II Gel Extraction kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

#### **III.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción**

La digestión de fragmentos de DNA se realizó con endonucleasas de restricción de tipo II. Las condiciones de la digestión, tanto doble como simple, así como las de parada de la reacción, fueron las indicadas por la casa comercial según las enzimas empleadas.

#### **III.2.6. Ligación de fragmentos de DNA**

Los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR con extremos romos se ligaron al plásmido pSPARK®I (Canvax, España) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial.

#### **III.2.7. Determinación y análisis de secuencias de DNA**

La secuenciación del DNA se realizó por SECUGEN (Madrid) y las secuencias se analizaron con el grupo de programas LASERGENE (DNASar, Estados Unidos). Para los alineamientos se usaron los programas ClustalX y GeneDoc. El análisis de los árboles filogenéticos se llevó a cabo usando el método del vecino más cercano (Neighbor-joining) con la corrección de Kimura para múltiples sustituciones y un muestreo “bootstrap” de 1000 replicados. Para la visualización y manipulación del dendograma se empleó el programa TreeView. Las predicciones bioinformáticas sobre la localización subcelular se obtuvieron usando varios programas diferentes: Target P 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), WoLF-PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) y ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>). Los dominios conservados en las secuencias de

aminoácidos deducidas se analizaron con el programa del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) y el programa Pfam (<http://pfam.xfam.org/>).

### III.2.8. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR

Todas las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 50  $\mu$ l conteniendo DNA molde,  $MgCl_2$  1,5-3 mM, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 0,2-1 mM, oligonucleótidos directo y reverso 0,5  $\mu$ M, DNA polimerasa 1-2,5 U y tampón 1x suministrado por las casas comerciales. Los distintos tipos de DNA polimerasas empleados en este trabajo se recogen en la Tabla 4.

**Tabla 4. DNA polimerasas empleadas en este trabajo.**

Enzima	Casa comercial	Descripción
MyTaq <sup>TM</sup> DNA Polymerase	Bioline, España	Enzima cuyos productos de PCR poseen desoxiadenosina en sus extremos.
MyTaq <sup>TM</sup> HS DNA Polymerase	Bioline, España	Enzima unida a un anticuerpo que requiere alcanzar 95°C para ser activada, incrementándose así la especificidad de hibridación de los oligonucleótidos. Generan productos de PCR con desoxiadenosina en los extremos.
ACCUZYME <sup>TM</sup> DNA Polymerase	Bioline, España	Enzima de alta fidelidad de copia que posee actividad DNA polimerasa 5'-3' y exonucleasa "proofreading" 3'-5'. Generan productos de PCR romos.
VELOCITY DNA Polymerase	Bioline, España	Enzima de alta fidelidad de copia que posee actividad DNA polimerasa 5'-3' y exonucleasa "proofreading" 3'-5'. Generan productos de PCR romos.

Todas las reacciones de PCR realizadas constaron de una fase inicial de desnaturalización a 95 °C, seguida de 30-35 ciclos que consistían en una primera etapa de desnaturalización a 95 °C, una segunda de hibridación de los oligonucleótidos con el DNA molde a la temperatura adecuada y una tercera etapa de extensión a 72 °C. La duración de las etapas de cada ciclo fue la especificada por las casas comerciales teniendo en cuenta el tamaño del fragmento de DNA a amplificar. Cuando se empleó como DNA molde una alícuota de la genoteca indicada en el apartado III.2.1., fue necesaria una fase de calentamiento inicial más duradera (10 min a 95 °C) que desnaturalizase las proteínas de la cápsida viral permitiendo la liberación del material genético a la mezcla de reacción.

### **III.2.9. Purificación de productos de PCR**

Cuando los productos amplificados mediante PCR se usaron como molde en otra reacción de PCR, se sometieron a un procedimiento de purificación mediante el kit “QIAquick PCR Purification Kit” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **III.3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA**

### **III.3.1. Aislamiento de RNA de tejidos de olivo**

#### **III.3.1.1. Aislamiento de RNA de mesocarpo y semillas de olivo**

El aislamiento de RNA total se realizó utilizando disoluciones previamente tratadas con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,1% (v/v) durante 16 h y autoclavadas para inhibir las RNasas, material de plástico libre de RNasas, y material de vidrio esterilizado por calentamiento durante 8 h a 180 °C. Muestras de 1-2 g de tejidos de olivo, congeladas y conservadas a -80 °C, se trituraron en un mortero que contenía nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que posteriormente se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 ml. A continuación, se añadieron 5 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 100 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM y SDS al 2% (p/v)), 50 µl de β-mercaptoetanol y 2,5 ml de fenol. Si el tejido procesado era mesocarpo u hoja, se añadió también polivinil polipirrolidona (PVPP) al 2% (p/v) que retira los compuestos fenólicos presentes al formar con estos un complejo, facilitándose la extracción de los

ácidos nucleicos. Tras agitar suavemente durante 5 min, se añadieron 2,5 ml de cloroformo y se agitó nuevamente durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 2.500 g durante 10 min, se recogió la fase superior y se repitió la extracción de esta fase con fenol y cloroformo dos veces más. Los ácidos nucleicos se precipitaron añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 3 volúmenes de etanol absoluto e incubando durante 30 min a -80 °C. Tras centrifugar a 2.500 g durante 30 min a 4 °C, se resuspendió el precipitado en 2,5 ml de agua destilada estéril tratada con DEPC y se añadieron 2,5 ml de LiCl 5 M, incubándose durante 16 h a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril tratada con DEPC. El RNA se precipitó de la misma forma descrita anteriormente para los ácidos nucleicos. El precipitado de RNA se lavó dos veces con etanol al 70% (v/v), se resuspendió en 25 µl de agua destilada estéril tratada con DEPC y se conservó a -80 °C.

#### III.3.1.2. Aislamiento de RNA de hojas de olivo

Para la extracción de RNA procedente de hojas de olivo se empleó el kit “Spectrum total RNA” de Sigma, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### III.3.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa

Para comprobar la integridad del RNA obtenido, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1,4% (p/v) en tampón MEN (ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico (MOPS) 20 mM pH 7,0, NaAc 5 mM y Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM) con bromuro de etidio 4 µg/ml. El tratamiento desnaturalizante previo de las muestras se realizó incubando a 65 °C durante 15 min una mezcla de volumen final 20 µl que contenía 4 µg de RNA total, tampón MEN, formaldehído 2,2 M y formamida al 50% (v/v). Tras enfriar en hielo durante 2 min, se añadieron 2 µl de solución de carga [azul de bromofenol al 0,25% (p/v), glicerol al 50% (v/v) y Na<sub>2</sub>EDTA 1mM] y se aplicó la muestra al gel. La electroforesis se llevó a cabo en tampón MEN, a 50 V durante 2h.

#### III.3.3. Síntesis de cDNA

Como paso previo a la síntesis de cDNA, el RNA obtenido se trató con DNasa para la eliminación de restos del DNA genómico. Para ello, muestras de 10 µg de RNA



total se procesaron con el “TURBO DNA-free kit” (Ambion, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, para la síntesis de cDNA se empleó el kit “SuperScript™ III First-Strand Synthesis System” (Invitrogen), partiendo de 5 µg de RNA total libre de DNA genómico y siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial.

#### **III.3.4. Análisis de RNA mediante PCR cuantitativa en tiempo real**

El análisis de expresión de los genes *LOX* y *HPL* de olivo se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) usando un termociclador CFX Connect™ (Bio-Rad) y el “iTaQ Universal SYBR® Master Mix” (Bio-Rad).

Los oligonucleótidos utilizados, que se recogen en la Tabla 5, se diseñaron con el programa Primer3 4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) a partir de la secuencia de los extremos 3' de cada uno de los genes (incluyendo parte de la región codificante 3' final y parte de la región 3' no codificante), excepto en el caso del gen de la ubiquitina 2 (*UBQ2*) de olivo donde únicamente se usó la región 3' no codificante, de forma que la longitud fuese de 19-23 pb, la  $T_m$  de  $60 \pm 1$  °C y que generasen amplicones de 100-250 pb. Los oligonucleótidos seleccionados fueron analizados con el programa *Gene Runner* 3.05 (Hastings Software Inc.) para comprobar que no se formaban estructuras secundarias inter e intracatenarias. Por último, se comprobó mediante búsqueda en BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que las secuencias eran específicas de cada gen.

Tabla 5. Oligonucleótidos para qRT-PCR empleados en este trabajo.

Gen	Nombre	Secuencia	Amplificación (pb)
<i>Oe1LOX2</i>	MN55	5'-GAGAATTGGGTGCGTTCATAC-3'	158
	MN56	5'-TCCTCTGGTGTGGCTAATGTC-3'	
<i>Oe2LOX2</i>	MN88	5'-TCGCTGGGAAAGTGAAAGAG-3'	164
	MN89	5'-TCAAATGGAAACGCTGTTAGG-3'	
<i>Oe3LOX2</i>	LG38	5'-CGGTGTCCCTCCTTATGAAC-3'	129
	LG39	5'-TTGCATGCTCTGACTGGAAC-3'	
<i>OeHPL</i>	MN76	5'-TCTCATACCCTTTCTGGCTTG-3'	175
	MN77	5'-ATCGTAAACCCACCAAATGC-3'	
<i>OeUBQ2</i>	OeUBQ2f3	5'-AATGAAGTCTGTCTCTCCTTTGG-3'	132
	OeUBQ2r3	5'-AAGGGAAATCCCATCAACG-3'	

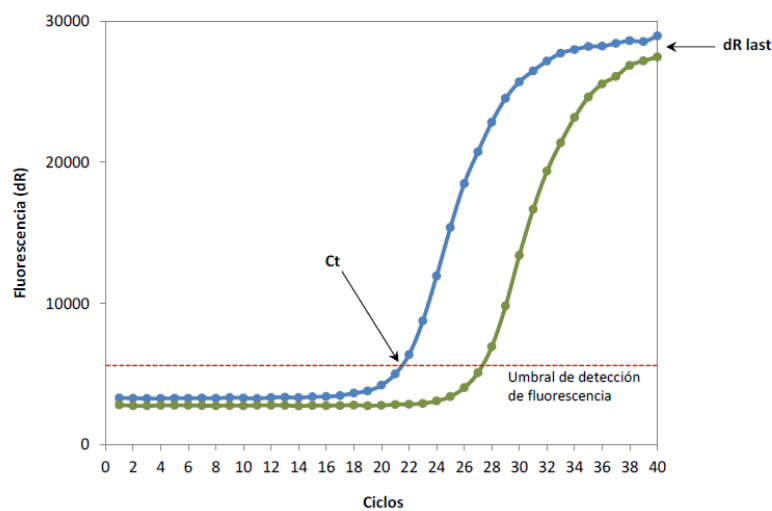
La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 10 µl, iTaq Universal SYBR® Master Mix 1x, oligonucleótidos directo y reverso 100 nM cada uno y 2 µl de la dilución adecuada del cDNA, la cual se seleccionó en función de la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos. Las reacciones, incluyendo los controles negativos, se llevaron a cabo por duplicado en placas de polipropileno de 96 pocillos (FrameStar®96 4titude, Reino Unido) cubiertas con film óptico (gTPbio, España).

El programa de PCR utilizado constaba de una etapa inicial de desnaturalización y activación de la DNA polimerasa durante 3 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos consistentes en una etapa de desnaturalización durante 10 s a 95 °C y otra de hibridación de los oligonucleótidos de 1 min a 60 °C.

Para confirmar la presencia de un único producto de amplificación y descartar la formación de dímeros de oligonucleótidos, se realizó para cada muestra una curva de disociación inmediatamente después de finalizar la reacción, que consistió en una etapa

de desnaturalización inicial de 1 min a 95 °C y otra de hibridación a 60 °C seguida de un incremento de temperatura de 0,5 °C s<sup>-1</sup> hasta volver a alcanzar los 95 °C.

Como método de generación de fluorescencia se empleó SYBR Green, el cual emite fluorescencia al unirse al cDNA de doble cadena, de manera que ésta aumenta proporcionalmente a la cantidad de cDNA inicial. Cuando el incremento de fluorescencia (dR) se expresa frente al número de ciclos, se obtiene una curva de amplificación (Fig. 8). El ciclo umbral (Ct) es el primer ciclo de la reacción de PCR en el que el instrumento es capaz de distinguir la fluorescencia generada frente al fondo. A partir de este punto es cuando la reacción se encuentra en fase exponencial, existiendo una relación lineal entre el logaritmo del incremento de fluorescencia y el número de ciclos. El valor de Ct es inversamente proporcional al número de copias de cDNA de partida, de manera que cuanto mayor es la cantidad de cDNA molde inicial, menos ciclos son necesarios para que el producto de reacción se acumule y pueda ser detectado, alcanzándose más rápidamente el Ct. De esta forma el Ct nos permite cuantificar el cDNA de partida presente en la muestra que, dado que proviene del mRNA retrotranscrito, permite cuantificar el nivel de expresión génica.



**Figura 8. Curva de amplificación de la qRT-PCR.**

Para determinar la eficiencia de amplificación de cada pareja de oligonucleótidos, se realizó la curva estándar por triplicado, preparando diluciones seriadas de las muestras de cDNA (1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800 y 1:1600) y representando los valores de Ct frente al logaritmo de las diferentes diluciones de

cDNA. En todos los casos, el valor de la pendiente de la recta estaba comprendido entre -3,1 y -3,6, lo que significaba que la reacción tenía una eficiencia de amplificación ( $E = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1 \times 100$ ) de 90-110%. Asimismo, el coeficiente de regresión era  $\geq 0,985$ , lo cual indicaba que las condiciones del ensayo eran aceptables en términos de precisión, reproducibilidad y sensibilidad.

Los niveles de expresión de los genes *LOX* y *HPL* de olivo fueron calculados mediante cuantificación relativa usando el gen de expresión constitutiva *OeUBQ2* como control endógeno (normalizador o *housekeeping*), ya que su nivel de expresión no variaba en ninguna de las muestras de los experimentos realizados. Para los cálculos numéricos de los niveles relativos de expresión se emplearon dos métodos, tras comprobar que la eficiencia de amplificación de las muestras eran comparables. En el caso del análisis de expresión del gen *Oe3LOX2* en Picual y Arbequina y del gen *OeHPL* en hojas de olivo transformado, se utilizó el método “ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ” (Livak y Schmittgen, 2001) refiriendo al valor de  $C_t$  de una de las muestras (calibrador) en cada experimento.

$$\Delta C_t (\text{muestra}) = C_t (\text{muestra}) - C_t (\text{normalizador})$$

$$\Delta C_t (\text{calibrador}) = C_t (\text{calibrador}) - C_t (\text{normalizador})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{muestra}) - \Delta C_t (\text{calibrador})$$

En cambio, cuando se determinaron los niveles de expresión de los genes *Oe1LOX2*, *Oe2LOX2*, *Oe3LOX2* y *OeHPL* en las variedades e individuos del cruzamiento Picual x Arbequina seleccionados, se empleó el método “ $2^{-\Delta C_t}$ ” (Pfaff 2005) que no usa calibrador, ya que de esta forma se pueden comparar los niveles de expresión de distintos genes.

La determinación de los niveles de expresión de cada muestra se realizó por triplicado, realizando dos réplicas en cada placa. Los resultados obtenidos están expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (SD).

### III.4. AISLAMIENTO DE UN CLON DE cDNA CORRESPONDIENTE A UNA LIPOXIGENASA DE OLIVO

A partir de la base de datos de ETSs (*Expressed sequence tags*) de olivo generada en el proyecto OLEAGEN (Muñoz-Mérida et al., 2013), se realizaron búsquedas de nuevos genes que presentaran un alto grado de similitud con los genes *LOX* de olivo (*Oep1LOX2*, *Oep2LOX2* y *Oep2LOX1*) previamente aislados en el grupo (Padilla et al., 2009, 2012). Se seleccionó una secuencia que presentaba un alto nivel de similitud con los genes anteriormente descritos, la cual denominamos *Oep3LOX2*, ya que la mayor similitud la mostraba con los genes *LOX* de tipo 2.

A partir de la secuencia 5' y 3' no codificantes conocidas del gen *Oep3LOX2*, se diseñaron cuatro oligonucleótidos, dos en sentido directo: LG13 (5'-ATCCACTTGCAGTATTCACC-3') y LG15 (5'-TCACCAACTGATCGGATTCC-3'); y dos en sentido reverso: LG14 (5'-CCACAAACGATGTACCACG-3') y LG16 (5'-GAATTGCATGCTCTGACTGG-3'). Posteriormente, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR con la enzima VELOCITY DNA polimerasa, una primaria usando como molde una alícuota de la genoteca de cDNA y otra secundaria anidada empleando como molde los productos purificados de las reacciones primarias. El fragmento amplificado se clonó en el vector pSPARK®I y se secuenció en los dos sentidos, comprobándose que se trataba del clon completo.

### III.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE TEJIDOS DE OLIVO

#### III.5.1. Obtención de extractos crudos de mesocarpo de aceituna

Los extractos crudos utilizados para medir la actividad LOX se obtuvieron en frío (0-4 °C) a partir de 4 g de mesocarpo de aceituna fresca procedentes de 25 frutos, homogeneizados en presencia de 16 ml de tampón de extracción LOX [Na-fosfato 100 mM pH 6,7, Tritón X-100 0,1% (v/v), Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, benzamidina 0,1 M, ácido aminocaproico 5 mM, fluoruro de sulfurilfenilmetano (PMSF) 0,1 mM] y PVPP 5% (p/v).

Para la obtención de los extractos crudos usados para ensayar las actividades HPL y ADH, se partió de polvo acetónico de mesocarpo de aceituna. El polvo se preparó triturando mesocarpo fresco de frutos recién cosechados con acetona a -20 °C,

con una relación de 15 ml de acetona por g de tejido. El extracto de tejido vegetal en acetona se filtró a vacío y tras varios lavados con acetona y éter a -20 °C se obtuvo un polvo fino que se secó y conservó a -20 °C. La obtención del extracto crudo se llevó a cabo triturando 0,125 g de polvo acetónico en 3 ml de tampón de extracción [Hepes 0,05 M pH 7,5; KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM; EDTA 2 mM; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 2 mM; ácido ascórbico 0,1%; Tritón X-100 0,5% y ditioneitol (DTT) 7 mM para la actividad HPL; tampón fosfato sódico 0,05 M pH 7,2; β-mercaptoetanol 14 mM; DTT 2 mM y 10% de glicerol para la actividad ADH]. La mezcla se homogeneizó en Ultra-Turrax a 24.000 rpm con tres pulsos de 1 min cada uno. Tras centrifugar a 27.000 g durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante se filtró a través de tres capas de Miracloth®, constituyendo el filtrado el extracto crudo.

### **III.5.2. Obtención de extractos crudos de semilla de aceituna**

Los extractos crudos utilizados para medir la actividad AAT se obtuvieron a partir de semillas frescas trituradas en nitrógeno líquido. El polvo obtenido se homogeneizó en 30 volúmenes de tampón de extracción (Tris-HCl 0,05 M pH 8; 10% de glicerol y Tritón X-100 al 0,2%). La mezcla se homogeneizó en Ultra-Turrax a 24.000 rpm con tres pulsos de 1 min cada uno. Tras centrifugar a 27.000 g durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante se filtró a través de tres capas de Miracloth®, constituyendo el filtrado el extracto crudo.

### **III.5.3. Obtención de extractos crudos de hoja**

Para obtener extractos crudos enzimáticos a partir de hoja de olivo con objeto de medir la actividad HPL, se homogeneizó 1 g de hoja, triturada previamente en nitrógeno líquido, en 20 ml de tampón de extracción HPL (descrito anteriormente) y PVPP 50%. La mezcla se homogeneizó en Ultra-Turrax a 24.000 rpm con tres pulsos de 1 min cada uno. El homogeneizado se filtró al vacío empleando dos capas de Miracloth® y después se centrifugó a 27.000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante constituyó el extracto crudo.

### III.6. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

#### III.6.1. Lipoxigenasa

Para la preparación de los ácidos grasos poliinsaturados utilizados como sustrato, LA y LnA, se partió de 100 mg del correspondiente ácido graso que se emulsionaron con 3,57 ml de agua desoxigenada y 303  $\mu$ l de Tween-20. Por adición de 200  $\mu$ l de NaOH 2 N se formaron las sales sódicas, completándose con agua desoxigenada hasta un volumen final de 35,71 ml para obtener una concentración final de 10 mM en Tween-20 0,85% (v/v). Finalmente, se prepararon alícuotas de 1,5 ml bajo corriente de N<sub>2</sub> y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

El ensayo *in vitro* de la actividad LOX se realizó espectrofotométricamente según describe Axelrod et al. (1981) siguiendo el incremento de la A<sub>234</sub> debido a la formación de dienos conjugados en la hidroperoxidación del ácido graso poliinsaturado. La mezcla de reacción incluía 1,5 ml de tampón Na-fosfato 100 mM al pH óptimo de cada isoenzima, 25  $\mu$ l de disolución de LA ó LnA 10 mM y la cantidad suficiente de preparación enzimática (5-25  $\mu$ l) para que el incremento de A<sub>234</sub> en los primeros 30 s no fuera superior a 0,5. Una unidad de actividad LOX se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un  $\mu$ mol de hidroperóxido por min, siendo el coeficiente de extinción molar de este compuesto de 25.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Verhagen et al., 1977).

#### III.6.2. Hidroperóxido liasa

El 13-hidroperóxido, sustrato de la reacción catalizada por la HPL, se preparó por oxidación del ácido linolénico con lipoxigenasa comercial de soja, de acuerdo con Hamberg y Samuelsson (1967). Para ello, se tomaron 10 ml del ácido graso en concentración 10 mM en Tween-20 0,36% (v/v) y se añadieron 32,3 ml del tampón adecuado (Na-borato 100 mM pH 9,0) saturado en oxígeno y 25 U de actividad LOX. A continuación, se incubó la reacción en baño de hielo, con agitación durante 4 min y se siguió su transcurso mediante medidas periódicas de A<sub>234</sub>. La reacción se paró añadiendo 1,5 ml de HCl 35% cuando la A<sub>234</sub> se mantuvo constante. Para el aislamiento de los hidroperóxidos se utilizó la extracción en fase sólida con columna C18 (0,5 g). La fase se activó previamente con 10 ml de metanol y se acondicionó con 20 ml de agua. A continuación, se aplicó la mezcla de incubación y se lavó la columna con 6 ml de

hexano. Los hidroperóxidos se eluyeron finalmente con 10 ml de metanol y se purificaron mediante cromatografía en placa fina (TLC) utilizando placas de gel de sílice. El desarrollo de la placa se realizó con una mezcla hexano:éter dietílico:ácido acético (50:50:1). Se raspó la banda correspondiente al hidroperóxido y se eluyó con 10 ml de éter dietílico. Por último, se evaporó y se redisolvió en metanol ajustando espectrofotométricamente la concentración a 10 mM.

El ensayo *in vitro* se realizó espectrofotométricamente, siguiendo el descenso de la  $A_{234}$  debido a la desaparición de dienos conjugados por rotura de los hidroperóxidos. La mezcla de reacción que se utilizó incluía 1,5 ml de tampón Na-fosfato 100 mM pH 8,0, 8  $\mu$ l de disolución de sustrato 10 mM y 10-20  $\mu$ l de preparación enzimática. Una unidad de actividad HPL se define como la cantidad de enzima necesaria para descomponer un  $\mu$ mol de hidroperóxido por min. El coeficiente de extinción molar de este compuesto es de  $25.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Verhagen et al., 1977).

### III.6.3. Alcohol deshidrogenasa

La actividad alcohol deshidrogenasa se cuantificó espectrofotométricamente midiendo el descenso de la  $A_{338}$ , debido a la oxidación del NADPH, en una mezcla de reacción que contenía hexanal como sustrato. La mezcla de reacción contenía 1,5 ml de tampón Na-fosfato 0,1 M, pH 6,0, 30  $\mu$ l de NADPH 10 mM, 10  $\mu$ l de hexanal 1 M y 20  $\mu$ l de extracto enzimático. Una unidad de actividad ADH se define como la cantidad necesaria de enzima para oxidar un  $\mu$ mol de NADPH por min. El coeficiente de extinción molar de este compuesto es de  $6.160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### III.6.4. Alcohol aciltransferasa

La medida de actividad alcohol aciltransferasa se realizó espectrofotométricamente según Fellman et al. (1991). Se midió la  $A_{412}$  de la mezcla de reacción, longitud de onda a la que absorbe el compuesto que se forma como consecuencia de la reacción entre el ácido 5-5'-ditiobisnitrobenzoico (DTNB) con el grupo sulfhidrilo del CoA liberado en la formación del éster correspondiente. El coeficiente de extinción molar para este compuesto es de  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La mezcla de



reacción contenía 15 µl de acetil-CoA 10 mM, 5 µl de hexanol (98%), 25 µl de extracto crudo y 455 µl de tampón de medida (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 12 mM). Esta mezcla de reacción se incubaba a 35 °C durante 15 min, y se paraba por adición de 25 µl de DTNB 20 mM disuelto en etanol al 96%. Una unidad de actividad AAT se define como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µmol de CoA por min.

### **III.7. ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES**

#### **III.7.1. Extracción de aceite de oliva virgen**

Los distintos aceites estudiados fueron extraídos por triplicado mediante un sistema Abencor (Martínez et al., 1975) que simula a escala de laboratorio el proceso industrial de obtención del AOV. La molienda de la aceituna (1 kg) se llevó a cabo en un molino de martillo de acero inoxidable a 3.000 rpm y equipado con un tamiz de 5 mm. La pasta resultante se sometió inmediatamente al proceso de batido en contenedores de acero inoxidable de 1,2 l a 50 rpm durante 30 min a 30 °C. Terminada la etapa de batido, las pastas fueron centrifugadas en la centrífuga tipo cesta del sistema Abencor a 3.500 rpm durante 1 min. Tras la centrifugación, el aceite se obtuvo por decantación, se filtró a través de papel y fue inmediatamente almacenado a -20 °C hasta realizar el análisis de compuestos volátiles.

#### **III.7.2. Obtención de homogeneizados de mesocarpo de aceituna**

En aquellos experimentos en los que no se disponía de cantidad suficiente de aceituna para extraer aceite se optó por utilizar la aproximación de la cuantificación de compuestos volátiles a partir de homogeneizados de mesocarpo. Muestras de 4 g de mesocarpo de aceituna de una muestra representativa de diferentes frutos se trituraron en presencia de 8 ml de agua destilada mediante Ultra-Turrax T-25 a 24.000 rpm durante 4 min. Del homogeneizado obtenido se tomaron muestras de 1,5 ml por triplicado, en viales de 12 ml conteniendo 1,5 ml de una disolución saturada de CaCl<sub>2</sub> para inactivación enzimática. Posteriormente, los volátiles formados en el homogeneizado se analizaron utilizando la técnica SPME/HRGC que se describe en el apartado III.7.4.

### **III.7.3. Obtención de homogeneizados de hoja de olivo**

Para el análisis de compuestos volátiles procedentes de hojas de olivo transformado, se realizaron homogeneizados de dicho tejido. Las hojas fueron trituradas en nitrógeno líquido y posteriormente homogeneizadas en Ultra-Turrax T-25 a 24.000 rpm durante 30 s, en presencia de un tampón de extracción compuesto por fosfato sódico 200 mM pH 6,7, sorbitol 250 mM, EDTA 10 mM,  $MgCl_2$  10 mM y glicerol 1%. A continuación, la mezcla obtenida se incubó a 25 °C durante 5 min y posteriormente se tomaron muestras de 0,5 ml de homogeneizado por cuadruplicado en viales de 12 ml conteniendo 1,5 ml de  $CaCl_2$  saturado. Posteriormente, los volátiles formados en el homogeneizado se analizaron utilizando la técnica SPME/HRGC que se describe en el siguiente apartado.

### **III.7.4. Análisis de compuestos volátiles mediante SPME/HRGC**

La extracción de los compuestos volátiles responsables del aroma del aceite de oliva se llevó a cabo por duplicado mediante la utilización de la técnica SPME. Se analizaron muestras de 0,5 g de aceite en viales sellados de 10 ml. Para ello, las muestras se acondicionaban durante 10 min a 40 °C y los compuestos volátiles del espacio de cabeza se adsorbían en una fibra SPME del tipo DVB/Carboxen/PDMS (50/30  $\mu m$ ) durante 50 min a la misma temperatura. La adsorción en la fibra en los experimentos con homogeneizados de mesocarpio de aceituna se llevó a cabo del mismo modo.

En el caso de los compuestos volátiles procedentes de homogeneizados de hoja, la extracción se llevó a cabo por cuadruplicado mediante la utilización de la técnica SPME. Las muestras se acondicionaron durante 10 min a 40 °C y los compuestos volátiles del espacio de cabeza se adsorbían en una fibra SPME del tipo DVB/Carboxen/PDMS (50/30  $\mu m$ ) durante 30 min a la misma temperatura.

El análisis se llevó a cabo mediante HRGC por desorción directa de la fibra SPME en el inyector a 250 °C en un equipo Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna DB-Wax 20M (60 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu m$ ) y detector de ionización de llama

operando a 250 °C. Como gas portador se empleó nitrógeno y la temperatura del horno fue de 40 °C iniciando una rampa de 2 °C min<sup>-1</sup> hasta los primeros 14 min de análisis y posteriormente con una rampa de 7 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar 175 °C. Los compuestos volátiles presentes en los aceites y homogeneizados fueron cuantificados a partir de curvas de calibrado calculadas para cada compuesto en aceite de girasol alto oleico desodorizado. La identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo mediante análisis por HRGC-MS, con ayuda de la librería de espectros Wiley/NBS y el índice de retención de patrones (Tab. 6). Los compuestos volátiles se agruparon en función del ácido graso de origen y la rama de la que proceden en el caso de la ruta de la LOX, así como ésteres, terpenos y compuestos ramificados procedentes del metabolismo de los aminoácidos (BC). Los datos cuantitativos para cada clase de compuestos eran la suma de los contenidos de los siguientes compuestos:

- Compuestos C6/LnA: (*E*)-hex-3-enal, (*Z*)-hex-3-enal, (*Z*)-hex-2-enal, (*E*)-hex-2-enal, (*E*)-hex-3-en-1-ol, (*Z*)-hex-3-en-1-ol, (*E*)-hex-2-en-1-ol.
- Compuestos C6/LA: hexanal, hexan-1-ol.
- Compuestos C5/LnA: pent-1-en-3-ona, (*Z*)-pent-2-enal, (*E*)-pent-2-enal, pent-1-en-3-ol, (*E*)-pent-2-en-1-ol, (*Z*)-pent-2-en-1-ol y 7 dímeros de penteno.
- Compuestos C5/LA: 2-pentanona, 3-pentanona, pentanal y pentan-1-ol.
- Ésteres volátiles: acetato de hexilo, acetato de (*Z*)-hex-3-en-1-ilo, acetato de (*E*)-hex-2-en-1-ilo, acetato de metilo, acetato de etilo, hexanoato de metilo y hexanoato de etilo.
- Terpenos: limoneno y  $\alpha$ -ocimeno.
- BC: 2-metil-butanal, 3-metil-butanal y 2-metil-butan-1-ol

**Tabla 6. Identificación de compuestos volátiles en el aceite de oliva virgen por análisis SPME-GC-MS.**

Número <sup>a</sup>	Compuesto	Código <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>	RI
1	hexano		MS, RI, Std	600
2	penta-1,4-dieno		MS	672
3	penta-1,3-dieno		MS	692
4	heptano		MS, RI, Std	700
5	acetaldehído		MS, RI, Std	706

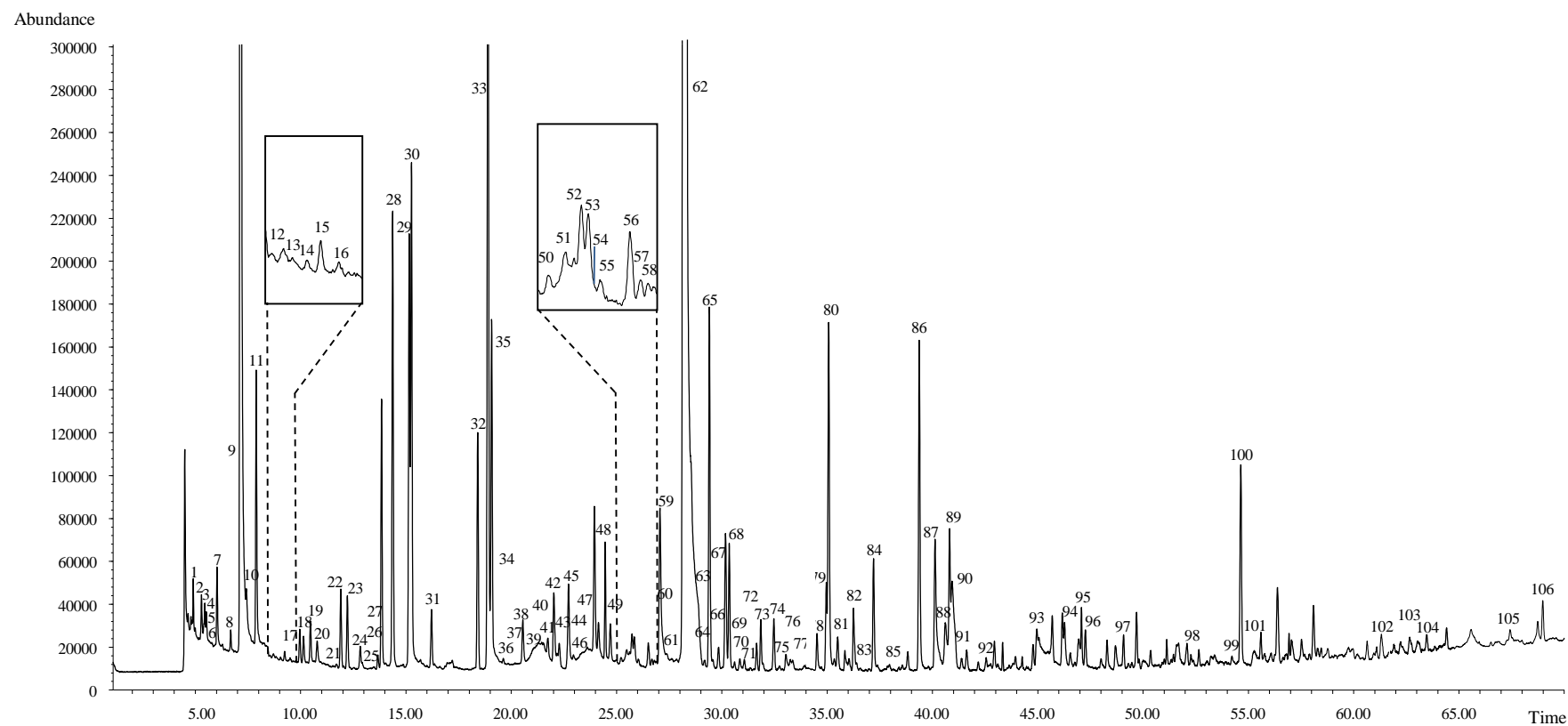
6	ciclohexano		MS, RI, Std	721
7	dimetil-sulfóxido		MS, RI, Std	747
8	octano		MS, RI, Std	800
9	acetona		MS, RI, Std	817
10	metil acetato	E-4	MS, RI, Std	829
11	oct-1-eno		MS, RI	836
12	butanal		MS, RI, Std	878
13	2,4-dimetil-hept-1-eno		MS	879
14	etilacetato	E-5	MS, RI, Std	891
15	2,4-dimetil-hexano		MS	898
16	nonano		MS, RI, Std	900
17	2-metil-butanal	BC-1	MS, RI, Std	915
18	3-metil-butanal	BC-2	MS, RI, Std	919
19	2-metil-etanol		MS, RI, Std	927
20	etanol		MS, RI, Std	934
21	4,4-dimetil-ciclopent-2-eno		MS	955
22	dímero de penteno-1	5C-7	MS, RI	959
23	dímero de penteno-2	5C-8	MS, RI	967
24	pentan-3-ona	5C-14	MS, RI, Std	980
25	pentanal	5C-15	MS, RI, Std	983
26	3,5-dimetil-octano		MS	996
27	decano		MS, RI, Std	1000
28	dímero de penteno-3	5C-9	MS, RI	1012
29	pent-1-en-3-ona	5C-1	MS, RI, Std	1025
30	dímero de penteno-4	5C-10	MS, RI	1026
31	tolueno		MS, RI, Std	1042
32	dímero de penteno-5	5C-11	MS, RI	1078
33	dímero de penteno - 6	5C-12	MS, RI	1087
34	hexanal	6C-8	MS, RI, Std	1088
35	dímero de penteno - 7	5C-13	MS, RI	1090
36	undecano		MS, RI, Std	1100
37	pentan-3-ol		MS, RI	1109
38	(Z)-pent-2-enal	5C-2	MS, RI, Std	1113

39	prop-2-en-1-ol		MS, RI	1120
40	3-metilbutil acetato		MS, RI, Std	1128
41	etil-benzeno		MS, RI, Std	1131
42	( <i>E</i> )-pent-2-enal	5C-3	MS, RI, Std	1135
43	4-metilpent-3-en-2-ona		MS	1137
44	<i>p</i> -xileno		MS, RI, Std	1139
45	<i>m</i> -xileno		MS, RI, Std	1145
46	( <i>E</i> )-hex-3-enal	6C-1	MS, RI, Std	1149
47	( <i>Z</i> )-hex-3-enal	6C-2	MS, RI, Std	1158
48	pent-1-en-3-ol	5C-4	MS, RI, Std	1163
49	metil 2-metil-but-2-enoato		MS	1176
50	acetato de pentilo		MS, Std	1180
51	piridina		MS, RI, Std	1186
52	heptan-2-ona		MS, RI	1188
53	<i>o</i> -xileno		MS, RI, Std	1189
54	heptanal		MS, RI, Std	1191
55	hexanoato de metilo	E-6	MS, RI, Std	1193
56	dodecano		MS, RI, Std	1200
57	limoneno	T-1	MS, RI, Std	1201
58	3-metil-but-2-enal		MS	1207
59	( <i>Z</i> )-hex-2-enal	6C-3	MS, RI, Std	1209
60	3-metil-butan-2-ona		MS, RI	1213
61	2-metil-butan-1-ol	BC-3	MS, RI, Std	1211
62	( <i>E</i> )-hex-2-enal	6C-4	MS, RI, Std	1226
63	hexanoato de etilo	E-7	MS, RI, Std	1232
64	$\alpha$ -ocimeno	T-2	MS, RI, Std	1240
65	n.i. (hidrocarburo)		MS, RI	1244
66	1,3,5-trimetil-benzeno		MS, RI	1249
67	Pentan-1-ol	5C-16	MS, RI, Std	1253
68	n.i. (hidrocarburo)		MS, RI	1254
69	$\beta$ -ocimeno		MS, RI, Std	1257
70	octan-3-ona		MS, RI	1260
71	estireno		MS, RI	1264

72	<i>p</i> -cimeno		MS, RI	1275
73	acetato de hexilo	E-1	MS, RI, Std	1278
74	1,2,4-trimetil-benzeno		MS, RI	1287
75	octan-2-ona		MS, RI	1291
76	octanal		MS, RI, Std	1295
77	tridecano		MS, RI, Std	1300
78	( <i>E</i> )-pent-2-en-1-ol	5C-6	MS, RI, Std	1316
79	acetato de ( <i>Z</i> )-hex-3-en-1-ilo	E-3	MS, RI, Std	1323
80	( <i>Z</i> )-pent-2-en-1-ol	5C-5	MS, RI, Std	1324
81	( <i>Z</i> )-hept-2-enal		MS, RI	1330
82	acetato de ( <i>E</i> )-hex-2-en-1-ilo	E-2	MS, RI, Std	1341
83	6-metil-hept-5-en-2-ona		MS, RI	1343
84	hexan-1-ol	6C-9	MS, RI, Std	1355
85	( <i>E</i> )-hex-3-enol	6C-5	MS, RI, Std	1366
86	( <i>Z</i> )-hex-3-enol	6C-6	MS, RI, Std	1386
87	nonanal		MS, RI, Std	1397
88	tetradecano		MS, RI, Std	1400
89	( <i>E,E</i> )-hexan-2,4-dienal		MS, RI	1404
90	( <i>E</i> )-hex-2-enol	6C-7	MS, RI, Std	1407
91	isómero ( <i>E,E</i> )-hexan-2,4-dienal		MS	1409
92	( <i>E</i> )-oct-2-enal		MS, RI	1436
93	ácido acético		MS, RI, Std	1473
94	copaeno		MS, RI	1495
95	decanal		MS, RI, Std	1506
96	pentadecano		MS, RI, Std	1500
97	benzaldehído		MS, RI, Std	1535
98	( <i>E</i> )- $\alpha$ -bergamoteno		MS, RI	1591
99	$\alpha$ -farneseno		MS, RI	1630
100	benzoato de metilo		MS, RI	1632
101	( <i>E</i> )-dec-2-enal		MS, RI	1643
102	$\beta$ -farnesene		MS, RI	1755
103	benzoato de propilo		MS, RI	1770
104	salicilato de metilo		MS, RI	1791

105	ácido hexanoico	MS, RI	1858
106	alcohol benzílico	MS, RI	1886

<sup>a</sup> Número de pico en el cromatograma de la Fig. 9. <sup>b</sup> Código de compuestos en la tabla 6. <sup>c</sup> Los volátiles fueron identificados de acuerdo con lo siguiente: MS, librería Wiley/NBS y NIST por espectro de masa; RI, índice de retención de acuerdo con la literatura; Std, coelución con estándar químico.



**Figura 9. Identificación de compuestos volátiles en el aceite de oliva virgen por análisis SPME-GC-MS. (García-Vico et al., 2017)**



### **III.8. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **III.8.1. Determinación de la concentración de proteínas**

El contenido de proteína se determinó según el método descrito por Bradford (1976). Para ello, se tomó una alícuota de la muestra y se llevó hasta un volumen final de 0,8 ml con agua destilada. Se añadieron 0,2 ml de reactivo de proteínas y, tras agitar vigorosamente, se incubó durante 15 min en oscuridad y se determinó la  $A_{595}$ . Se empleó seroalbúmina bovina (BSA) como patrón.

#### **III.8.2. Cuantificación de ácidos nucleicos**

La determinación de la concentración y pureza de las muestras de ácidos nucleicos se realizó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm, según el método descrito por Sambrook et al. (1989). Se realizó la cuantificación considerando que un valor de  $A_{260}$  de 1,0 equivalía a  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  de DNA de doble cadena o  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  de RNA. La relación  $A_{260}/A_{280}$  permitió estimar la pureza de la muestra, considerando que valores inferiores a 1,8 indicaban la presencia de proteína.

### **III.9. REACTIVOS Y APARATOS**

#### **III.9.1. Reactivos**

Los componentes de los medios de cultivo y la agarosa fueron suministrados por Pronadisa (España).

Todos los tampones orgánicos, sales orgánicas, metabolitos y enzimas usados en bioquímica, detergentes y compuestos orgánicos, fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Estados Unidos), así como los antibióticos y aminoácidos.

Los disolventes orgánicos, ácidos y bases utilizados en bioquímica fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España), mientras que los empleados en biología molecular, así como las sales inorgánicas, se adquirieron a Merck.

Los tampones de carga para electroforesis, enzimas de restricción, RNasa A, marcadores de masa molecular para DNA y dNTPs fueron proporcionados por Fermentas. El azul de bromofenol y azul de Comassie por Millipore (Estados Unidos).

La LOX de soja y el PEG 8000 fueron adquiridos a Fluka (Estados Unidos) y el reactivo de Bradford a Bio-Rad.

Los gases utilizados fueron suministrados por Carburos Metálicos y Air Liquide, al igual que el nitrógeno líquido.

El agua utilizada en los experimentos estaba purificada mediante un sistema de cartuchos de purificación de agua Millipore, hasta un grado de purificación Milli-Q.

### **III.9.2. Aparatos**

El estudio del efecto de los factores abióticos se realizó en incubadores de precisión con control de temperatura, luz y humedad J.P. Selecta, modelo HOTCOLD-GL.

Para el crecimiento de microorganismos se utilizó el incubador con agitación orbital Infors modelo Ecotron ET25-TA-RC. La campana de flujo laminar horizontal usada para trabajar en condiciones de esterilidad fue de la marca Telstar, modelo AH-100.

Para la esterilización por filtración se usaron filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  (Sarstedt, Alemania) y en el caso de autoclavado se utilizó un Presoclave de 75 l J.P. Selecta.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en diferentes tipos de centrífugas dependiendo del volumen y la velocidad requerida. Para centrifugaciones a baja velocidad se usaron las centrífugas de mesa J.P. Selecta y Heraeus refrigerada modelo Megafuge 1.0 R. Para centrifugaciones a alta velocidad se usó una centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC5C, equipada con los rotores SS-34 y GSA.

Para el homogeneizado de las muestras se empleó un equipo dispersor Ultra-Turrax® modelo T25 basic (Ika®-Werke, Alemania).

Las amplificaciones por PCRs se realizaron en un termociclador MJ Research modelo PTC-200 y para las qRT-PCR se utilizó el termociclador CFX Connect™ de Bio-Rad.

La visualización de bandas de ácidos nucleicos separadas en geles de agarosa y poliacrilamida se realizó en un transiluminador ChemiGenius2 (Syngene, Estados Unidos), el cual incluye una cámara FIREWIRE CCD de alta resolución y está acoplado a un ordenador con el programa GeneSnap para determinar las condiciones de captura de la fotografía del gel. Cuando fue necesario cortar las bandas de DNA separadas en geles de agarosa para su posterior purificación, se empleó un transiluminador Vilber Lourmat (Alemania) modelo ECX-20.M.

La cuantificación de proteínas, la determinación de la densidad óptica de cultivos de microorganismos y las medidas de actividad LOX, HPL, ADH y AAT se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-640, equipado con lámparas de tungsteno (visible) y deuterio (ultravioleta). Para la cuantificación de ácidos nucleicos se usó un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop, Estados Unidos) que permite la determinación de la absorbancia empleando solamente un 1 µl de muestra.

Las columnas de extracción en fase sólida Superclean LC-18 y la fibra SPME del tipo DVB/Carboxen/PDMS (50/30 µm) fueron adquiridas a Supelco (Estados Unidos).

Para el análisis de compuestos volátiles se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna DB-Wax 20M (60 m x 0,25 mm, 0,25 µm) y detector de ionización de llama.



## **IV. Resultados**



## **IV. RESULTADOS**

### **IV.1. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE UN cDNA CORRESPONDIENTE A UNA LIPOXIGENASA DE OLIVO**

#### **IV.1.1. Aislamiento de un clon de cDNA**

A partir de la base de datos de ESTs de olivo generada en el proyecto OLEAGEN (Muñoz-Mérida et al., 2013), se realizaron búsquedas de nuevas secuencias que mostraran un alto grado de similitud con la de los genes *LOX* de olivo previamente aislados y caracterizados: *Oe1LOX1* (Palmieri-Thiers et al., 2009), *Oep2LOX1* (Padilla et al., 2012), y *Oep1LOX2* y *Oep2LOX2* (Padilla et al., 2009). De esta forma, se identificó una nueva secuencia que mostraba una alta similitud con otras proteínas LOX de tipo 2 de plantas, por lo que se denominó *Oep3LOX2*.

Para la obtención del clon completo de cDNA, se diseñó una pareja de oligonucleótidos directo y reverso a partir de las regiones 5' y 3' no codificantes del gen, respectivamente. Estos oligonucleótidos, se emplearon en una reacción de PCR junto a una alícuota de cDNA procedente de mesocarpo de aceituna de 28 SDF. Para llevar a cabo la reacción de PCR se empleó una DNA polimerasa con actividad correctora de errores, para evitar fallos en la secuencia introducidos durante la amplificación. Como resultado se obtuvo un fragmento con el tamaño esperado, el cual fue aislado y secuenciado en las dos direcciones, comprobándose que se trataba de un clon completo de cDNA.

*Oep3LOX2* presentaba un tamaño de 2852 pb. A partir de la región codificante del gen *Oep3LOX2*, se dedujo una proteína de 915 aminoácidos con una masa molecular calculada de 104,3 kDa y un pI de 8,3. A ambos lados de la región codificante se encontraban las regiones 5'y 3' no codificantes, con un tamaño de 32 pb y 70 pb, respectivamente.

#### **IV.1.2. Análisis de la secuencia**

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los genes *LOX* previamente caracterizados y del obtenido en este trabajo (Fig. 10) mostraba que *Oep3LOX2* presentaba un 39, 37, 53 y 47 % de identidad con respecto a *Oe1LOX1*, *Oep2LOX1*, *Oep1LOX2* y *Oep2LOX2*, respectivamente.

Oe1LOX1 : -----MLSHIVE : 7  
 Oep2LOX1 : -----MLEKLLG : 7  
 Oep1LOX2 : MALTKEIMGFSLMQ-KSSFLGSSN-FLVYRKHNQFCFNTVLVPAKRKRQ-EKRASKVPT : 57  
 Oep2LOX2 : -MLN---LSISKSQTHQILLPNCNPFFFGRNASFAGNPKFKSVRKHENVRVGRGSSTIK : 56  
 Oep3LOX2 : -MLTSQPRPFTLRSEVTTYAEKH-HRLTRKTTFPFGFRRRVPIRAVISGGDNKTSAADV : 58

Oe1LOX1 : AFTGKNEE-----ENK---KKIKGKVLMKKNVLDNFND-FGGSVLDRVHELLGQKVSL : 56  
 Oep2LOX1 : SVCCKTRE-----EPKTEERKIRGTVLMMKKNVEMTDV-GASFLLRVHEIVCGKVTL : 59  
 Oep1LOX2 : LMAAISDKLDLVKVPDKAVKFKVRSVTVKNKHKEDFKET-IAKRWDFTDKIGRNVVL : 116  
 Oep2LOX2 : AVQTSAEK-----STTTTSATVTVTVQQTGGALHGLSRGLDIDGDLGRTLLV : 108  
 Oep3LOX2 : VVVEKPEEDNGSLASSKSGSINVKAVITTRKKMKERLTEK-IEDQWESFINGIGKGILI : 117

Oe1LOX1 : QLISSINGDPENKLKGKLGRAAYLEDWITFTSLTP-GDSAFHVTFDWEEEEEIGIPGAFI : 115  
 Oep2LOX1 : QLISSASHADFPANGSRGKLGKEYLEHWVTKFTSLSAKDDAMFNITFDWDES-MGVVPGAFI : 118  
 Oep1LOX2 : ELISS-ADIDPKTKG-PKKSNAVLKDWSSKSNLKTE--RVNYIAEFLVDSN-FGIPGAI : 171  
 Oep2LOX2 : ELVA-AELDPHTG-----SEKPKIKAYAHKKDKDGD--ETHYESNFNVPED-FGEVGAIT : 159  
 Oep3LOX2 : RLISS-EEIDEGTK--SGKSVESFVRGWLKPSNDPY--VIEYGADETVPOD-FGHPGAVL : 171

Oe1LOX1 : IQNFHHTFEFYLKTLTLEDVPGHGGPIHFEVCNSWVYPAEKYKTDVFEFTNKTYLPSETPEP : 175  
 Oep2LOX1 : IRNHHHSQFYLKKVTLEDVPG-HGQLQFVCNSWVYPAHRYKNDRVFFAYKTYLPCNTPEP : 177  
 Oep1LOX2 : VINKHQEFFLESTTIEGFAC--GPVHFSCNSWVQSRKDHPGKRIFFSNQPYLPNETPAG : 229  
 Oep2LOX2 : IENEHHEKMFVESVVIDGLY--GPINVTNSWIHSKFDNKEPRVFEVDKSYLPSNTPSG : 217  
 Oep3LOX2 : ITNFQDKEFFIVVWVHGFRK--GPSFERRADTWIHSRKDNPESTRITKKNQAYLPSQTPPG : 229

Oe1LOX1 : LVKYREEELVNLRCNGSGOLEEWDVRYDMAYYNDLGDPPDKGSDYARPVLGGSVEYYPYPRR : 235  
 Oep2LOX1 : LRAYREDELTNLRGDGSGTLKEWDRVYDMALYNDLGSPEKQGEYARPVLGDSKEHPYPRR : 237  
 Oep1LOX2 : LKAIREREIRDLRGDQGGERKLSDRYDFDIYNDLGNPDKGIDFVRPTLGGE-NIPYPRR : 288  
 Oep2LOX2 : LKIYREKELQILRGDGTGERKTFERIYDMVYNDLGDPPSSDLARPVLGQ-HPYPRR : 276  
 Oep3LOX2 : IKDIRREDLLSLRCNGKGERKLHERIYDMVYNDLGNPDKGEDTVRPVLGNE-HPYPRR : 288

Oe1LOX1 : GRTGRPPTKTDPNSESRIPLLTSLDIYIPRDERFGHLMKMSDFLAYALKSVVQFLIPFED : 295  
 Oep2LOX1 : GRTGREPNEKDPNSESQPLPLN-LNIYVPRDERFSHVKFLDFIGYSFKSLGQVLIPETEA : 296  
 Oep1LOX2 : CRTGRPPTDIDFNAESRVEKPL--PMYVPRDEQFEESKMNAFSTGRLLKAVLHNLIPSLMA : 346  
 Oep2LOX2 : CRTGRARTKTDPLSESRRGN-----VYVPRDEAFSEVKMQQFSAKTIYSVLHSLVPSIET : 331  
 Oep3LOX2 : CRTGRPHTKKDRFTETRVEKPH--PVYVPRDETFEETKONTFSAGRLKAALHNLIPLIAS : 346

Oe1LOX1 : LCDSIHNEFDSFEDILQIYEGCFKLPEGPLLNIFENIPFEMLKVLLRSDGEGLFKFPPLP : 355  
 Oep2LOX1 : VFDETINEFDDFQDVHKLIEGCIKLPDGHALKNTRECLPWESFKNLLHLDGGRPTQFPTP : 356  
 Oep1LOX2 : SISASNHDFKGFSDIDSLYSEGLLLKLGLQDELSKKIQLPKAVSKIQ-EGG--LTKYDIP : 403  
 Oep2LOX2 : SIIDSDLGFPHETATETLFNEGVLP-KQSTGFLANIPRLVKAIT-DVEKNVLEETP : 389  
 Oep3LOX2 : KLSSSDIPFTNFSIDIEKLYNDCVLLKEEEHKEK-KNQFLTAMNQVL-TVGDKLLTKYDIP : 404

Oe1LOX1 : QVIKDDKSAWRTEEEFAREMLAGVNPVITSRLLQEFFPPTSKLDPNLYGDQSTISGGHIEN : 415  
 Oep2LOX1 : DIHKNDRTAWRTDEEFGREMLAGVNPVITRRLQEFFPPASKLDPKVYGNQNSSMTGDQIEK : 416  
 Oep1LOX2 : KIISKDKFAWLRLDEFGRQALAGVNPVNTERLQSFPVCKLDPEITYGPQESALKEEHIVG : 463  
 Oep2LOX2 : QIYERDRFSWFRDEEFARQTLAGINPCRIELVTEWPLKSKLDPVAVYGAESAITTELVEK : 449  
 Oep3LOX2 : AIIKRDRAFWLRDNEFARQILAGVNPVNITQLLEELPILSTLDPATYGPPESAITREILEK : 464

Oe1LOX1 : KLDG-LTIDEAIRTNKLFIILNHDALMPYIKRINSTT-TKTYASRTLEFLQKDGSLKPLA : 473  
 Oep2LOX1 : NVNG-LTVEEALADNKLFIIDYHDVLIPIYRRINTTT-TKTYASRTVLLQDNGTLKPLA : 474  
 Oep1LOX2 : HUNG-MTVQEALANKLFIIDYHDIYLPFLDGINALDGRKEAYATRTIFFLTDLGLTKPIA : 522  
 Oep2LOX2 : EIGGFTTVKKALEEKKLFVLDYHDLFIPYVKKVREIKGTTLYGSRTIFFLMPSGTLRPLA : 509  
 Oep3LOX2 : EIHG-TTVEQALKGKRLFILDYHDMLLPFIEKMNSLPGRKAYASRTVLYYTNTGTLRPV : 523

Oe1LOX1 : IELSLHPDGYQFGAISKVYLEAEHGIDSSIWOLAKAYVAINDSGVHQLISHWLNTHAST : 533  
 Oep2LOX1 : IELSREQPDENVHDPISQVETSEHGIENSKWOLAKAYAAVNDSCYHQLISHWLNTHAVI : 534  
 Oep1LOX2 : IELSLPTAP--SSRSKQVTFPVDATTDWMWKLAKAHVCANDAGVHQLVNHWLRTHATI : 580  
 Oep2LOX2 : IELAREQIDG--KPQWKEVFEHCWDATGVWLWRLAKAHVLAHDSGEHQLVSHWLRTHCCT : 567  
 Oep3LOX2 : IELSLPTPS--SPSNKRIFTHGYHATTFWIWKLAKAHVCSNDAGVHQLVNHWLRTHASM : 581

★ ★

Oe1LOX1 : EPFVIATNRQLSVLYPIHKLLPHFRDTMNNINAVGRQILINAGGILEATVFPKYSMEMS : 593  
 Oep2LOX1 : EPFVIATNRRLSVLHPIYKLLQPHYRDTMNNINALARHTLINAGGILERTVFPARYAMEMS : 594  
 Oep1LOX2 : EPFIIAAHRQLSAMHPIFKLLPHMRYTLEINALARQSLISADGVIESCTTPGRYOMEIS : 640  
 Oep2LOX2 : EPYVIATNRQLSAMHPVYKLLPHPLRYTLEINALAREALINANGVIEKGTTPRKYSLEVS : 627  
 Oep3LOX2 : EPYIIATHRQLSSMHPVHKLLPHMRYTLEINALARQSLINGGGILEACVSPGKYSMEIS : 641

◆

Oe1LOX1 : AVIYKD-WVFTEQGLPADLTKRGMAVDDSNSPHGLRLIEDYPYAVDGLIWSAIKTWVQ : 652  
 Oep2LOX1 : ATIIYN-WNFAECALPEDLTKRGVAVIDPSQRHGLRLIEDYPFAVDGLIWSAIKDWN : 653  
 Oep1LOX2 : AAAYRNFWRFDLGLPADLIRRGMAVPDPTQPHGLKLLIEDYPYATDGLMIWTATENWVR : 700  
 Oep2LOX2 : SAAYDQLWQFDLQALPADLISRGMAVEDPAAPHGLKLAIEDYPYANDGLLIWDAIKKWT : 687  
 Oep3LOX2 : SAAYKSMWRFDMALPADLIRRGMAVEDSMESGVKLVIEDYPYAADGLLIWSAIKEMVS : 701

Oe1LOX1 : DYCNFYYSIDILVQKDAELQSWWTEVREKGGHGDKKNEPWWPKMQTRGELVDSCTTIIWMA : 712  
 Oep2LOX1 : DYCSIYYDKDDMIQDDKELQSWWELREEGHGDLKDEPWWPKMQTKYELVQTCTTIIWVA : 713  
 Oep1LOX2 : SYVNHYLLDSSILVCNDKELQAWYAESINVGHADLRHADWWPTLATPEDLTSILTIIWLA : 760  
 Oep2LOX2 : DYVTTYYPPEANLVQSDVELQEWTEIRTKHADKKDESWWPVLETPGDLIGILTIIWVA : 747  
 Oep3LOX2 : SYVDHYYSSEPNLSKSDVELQSWWDEIKNKGHYDKRNEPWWENLATKEDLSGILTIIWVA : 761

-

Oe1LOX1 : SALHAAVNFGQYPYAGYLPVRPTLSRRFMPEP--GKPEYDELKTNPDKVFLKTTITARLQT : 770  
 Oep2LOX1 : SALHAAVNFGQYPYAGYLPNRPTVSRRFMPEP--DTPEHAELEKDPDLSFLKTTITAQFQT : 771  
 Oep1LOX2 : SAQHAAVNFGQYPYGGYVPNRPEFLMRLLPDE--NDPEYAFIHADPQKYYSALPSLLQA : 818  
 Oep2LOX2 : SGHHAAVNFGQYDEAGYFPNRPTITRTNMPTEDPNDTEKEEFLKKPEEFILKCFPSQVQA : 807  
 Oep3LOX2 : SGQHAAVNFGQYPGGYFPNRPTIVRRSIEQE--GDYDKFLLNPEYTFILTSILPTQLQA : 819

★ ★  
 -----

■

Oe1LOX1 : LLGSLIEILSSHSSDEVYLGQR--DALEWTKDVEPLAEFDRFGTKIREVEERIKQMND : 828  
 Oep2LOX1 : LLGSLIEILSSHSTEEIYLGQR--DTSEWPSDKE-KEAFARFSTKLVKIENEIERNND : 828  
 Oep1LOX2 : TKFMAVVDTLSTHSPDEEYLGERHHQSIWSR-DAEVIESEYEFSAELRRIEKEIEKRNVD : 877  
 Oep2LOX2 : TIIVALLDVLSSHSPDEEYLGEN--IQPYWKDDKYINAIIEQFAGKVKEIEGIIIDARNTN : 865  
 Oep3LOX2 : TKVMVAQDTLSTHSADEEYINQLHDIQRLSFSDEPVOEIEQRFSTKIEEIEQIIHERNKN : 879

Oe1LOX1 : KKWRNRFVGPVNPYTLLYPTSEE-----GLTCKGIPNSVSI : 864  
 Oep2LOX1 : QRLRNRFVGPVNPYTLLYPNTSDYSKKGGLTVKGIPNSISI : 869  
 Oep1LOX2 : STLNRNSGAGVLPYELLAPSSGP-----GVTORGVPNSVSI : 913  
 Oep2LOX2 : CDLMNRSGAGVVPYQLLKPFSEA-----GVTCKGVPNSVSI : 901  
 Oep3LOX2 : IKLRNRNSGAGVVPYELLPLSPF-----GVTCKGIPNSISI : 915

★



**Figura 10. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *LOX* de olivo.** Los residuos idénticos y similares se muestran con fondo negro y gris, respectivamente. Los dominios de enlace al sustrato y al oxígeno aparecen subrayados en línea continua y discontinua, respectivamente. El dominio C-terminal conservado en las LOXs está recuadrado en rojo. Los cinco aminoácidos esenciales conservados implicados en el enlace al átomo de hierro en el sitio activo se indican con un asterisco. El residuo conservado de valina indicativo de enzimas LOX con actividad 9-LOX aparece recuadrado en azul. El residuo de fenilalanina indicativo de enzimas LOX con actividad 13-LOX aparece enmarcado en morado. El residuo de arginina determinante para la orientación inversa del sustrato en las LOXs de plantas se indica con un cuadrado, y el residuo de alanina que determina la estereoespecificidad de las LOXs como *S*-específicas se indica con un rombo. La secuencia del péptido señal de Oep1LOX2, Oep2LOX2 y Oep3LOX2 está subrayada en verde.

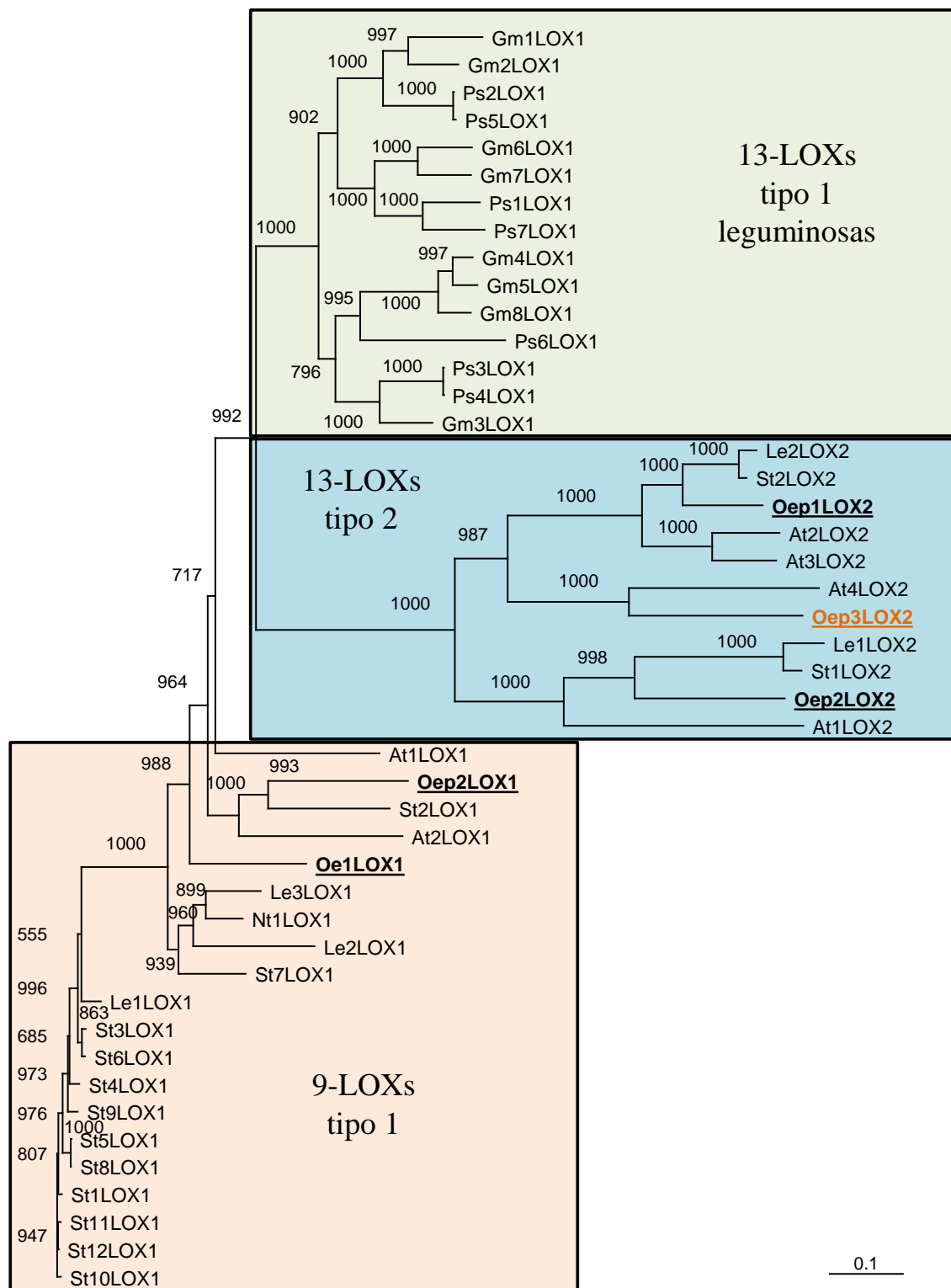
La secuencia de aminoácidos de Oep3LOX2 mostraba una alta similitud con las secuencias conocidas de LOXs de plantas. La LOX de sésamo (SiLOX6; XP\_011086753) presentaba el valor más alto de identidad (76 %) con Oep3LOX2.

Como se muestra en la Figura 10, la secuencia *Oep3LOX2* poseía los dominios conservados implicados en el enlace al sustrato y al oxígeno, y el dominio C-terminal. Además, presentaba tres residuos de histidina, uno de asparragina y uno de isoleucina que son esenciales para el enlace del átomo de hierro del sitio activo. También se observaba el residuo conservado de fenilalanina característico de enzimas LOX con actividad 13-LOX. Asimismo, contenía el residuo conservado de arginina que interacciona con el grupo carboxilo del ácido graso, y el residuo de alanina que determina la estereoespecificidad de las LOXs como una *S*-específica.

El análisis de la secuencia con los programas informáticos del NCBI y Pfam reveló que contenía un dominio PLAT N-terminal y el típico dominio lipoxigenasa.

Por otra parte, *Oep3LOX2* presentaba un péptido señal en el extremo N-terminal con las características de los péptidos de tránsito cloroplástico.

Para establecer la relación filogenética del gen *Oep3LOX2* de olivo, se incluyeron en un dendrograma su secuencia de aminoácidos deducida junto con secuencias de aminoácidos seleccionadas de LOXs de plantas (Fig. 11), incluyendo las LOXs de olivo previamente caracterizadas. *Oep3LOX2* se agrupaba claramente junto a las LOXs de tipo 2.



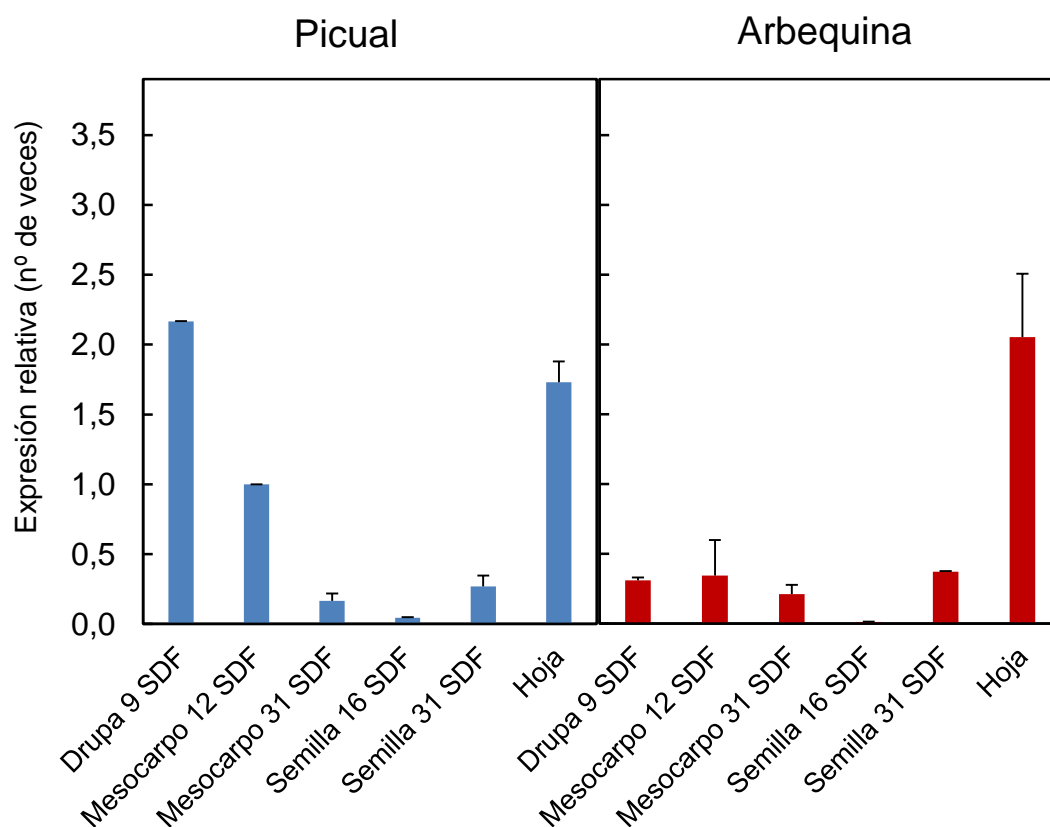
**Figura 11. Análisis filogenético de las enzimas LOX de plantas.** La LOX de olivo caracterizada en este trabajo está subrayada e indicada en naranja. Los números de acceso de las diferentes LOXs incluidas en este análisis son los siguientes: *Arabidopsis thaliana* (*At1LOX1*, Q06327; *At2LOX1*, CAC19365; *At1LOX2*, P38418; *At2LOX2*, AAF79461; *At3LOX2*, AAF21176; *At4LOX2*, AAG52309), *Glycine max* (*Gm1LOX1*, AAA33986; *Gm2LOX1*, AAA33987; *Gm3LOX1*, CAA31664; *Gm4LOX1*, BAA03101;

*Gm5LOX1*, AAB67732; *Gm6LOX1*, AAA96817; *Gm7LOX1*, S13381; *Gm8LOX1*, AAC49159), *Lycopersicon esculentum* (*Le1LOX1* o *TomloxA*, P38415; *Le2LOX1* o *TomloxB*, P38416; *Le3LOX1* o *TomloxE*, AAG21691; *Le1LOX2* o *TomloxC*, AAB65766; *Le2LOX2* o *TomloxD*, AAB65767), *Nicotiana tabacum* (*Nt1LOX1*, S57964), *Olea europaea* (*Oe1LOX1*; ACG56281; *Oep2LOX1*, EU513351; *Oep1LOX2*, EU513352; *Oep2LOX2*, EU513353), *Pisum sativum* (*Ps1LOX1*, AAB71759; *Ps2LOX1*, CAA55318; *Ps3LOX1*, CAA55319; *Ps4LOX1*, CAA30666; *Ps5LOX1*, CAA34906; *Ps6LOX1*, CAA53730; *Ps7LOX1*, CAC04380), *Solanum tuberosum* (*St1LOX1*, S44940; *St2LOX1*, AAD09202; *St3LOX1*, S73865; *St4LOX1*, CAA64766; *St5LOX1*, CAA64765; *St6LOX1*, AAB67860; *St7LOX1*, AAB67865; *St8LOX1*, AAB67858; *St9LOX1*, AAD04258; *St10LOX1*, AAB81595; *St11LOX1*, AAB81594; *St12LOX1*, CAB65460; *St1LOX2* o *LOX H1*, CAA65268; *St2LOX2* o *LOX H3*, CAA65269).

## IV.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *Oe3LOX2*

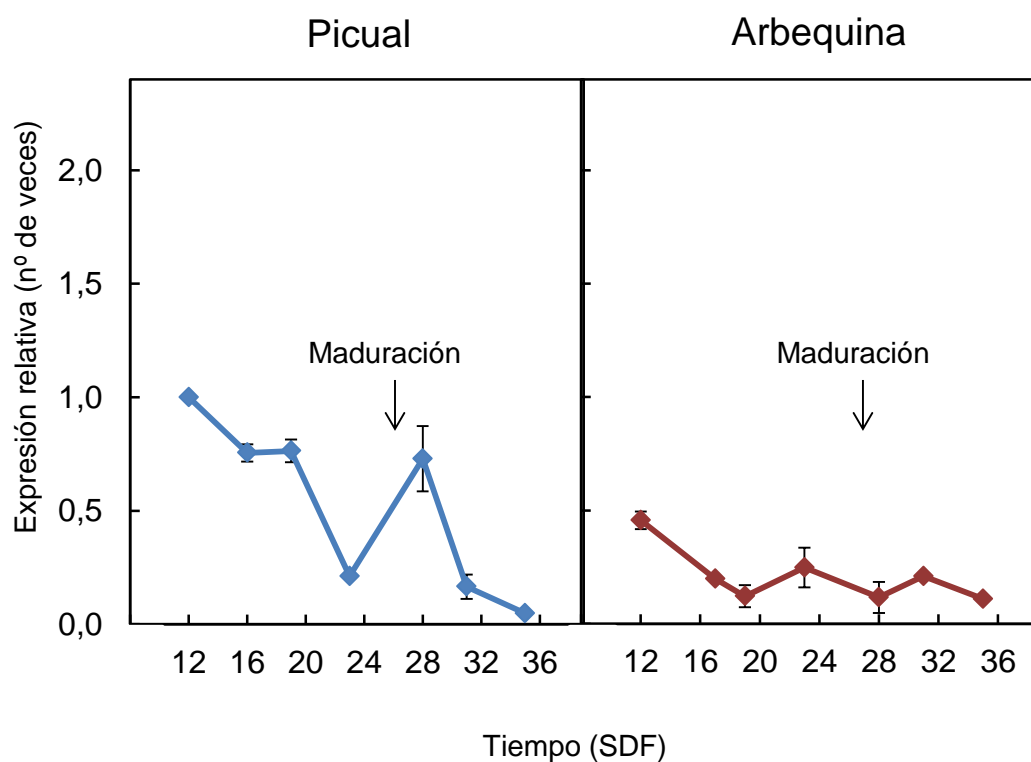
### IV.2.1. Regulación espacial y temporal

Con el fin de investigar el papel fisiológico y la posible contribución a la biosíntesis del aroma del AOV del gen *Oe3LOX2*, se han determinado sus niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR en distintos tejidos de la planta tales como drupa, mesocarpo, semilla y hoja. Como podemos observar en la Figura 12, el gen *Oe3LOX2* mostraba los niveles de expresión más altos en hojas de ambas variedades, y en drupa (9 SDF) y mesocarpo (12 SDF) de la variedad Picual. Por el contrario, los niveles de transcrito más bajos se observaron en semilla (16 SDF), tanto de la variedad Picual como de Arbequina.

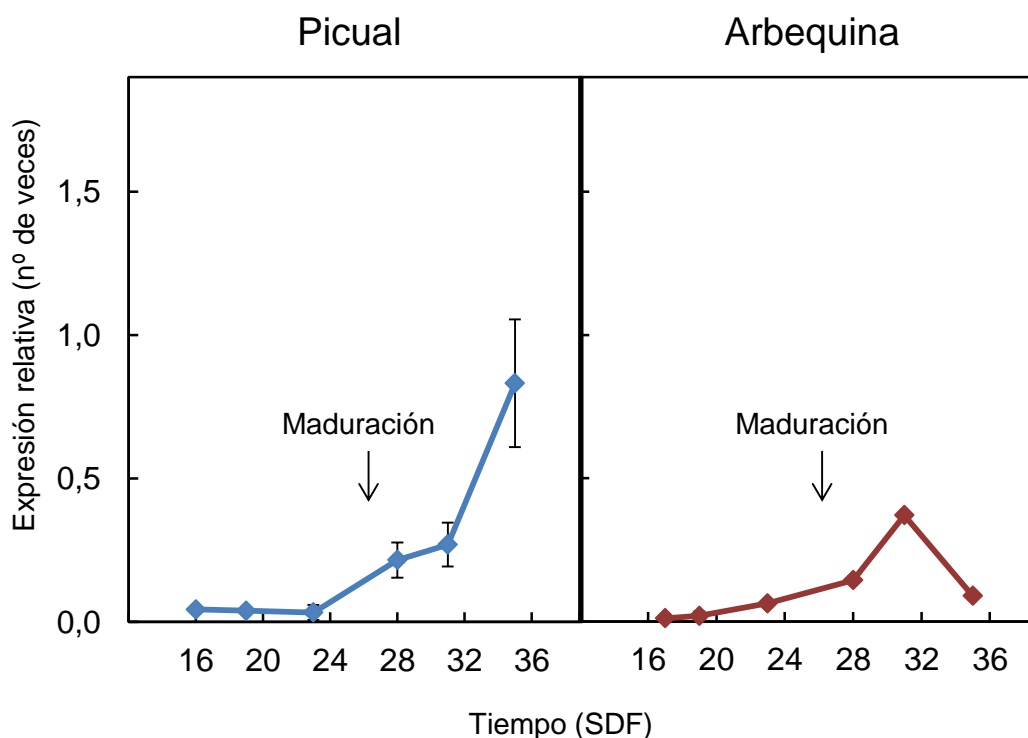


**Figura 12. Niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* en diferentes tejidos de las variedades Picual y Arbequina.** Los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* en el mesocarpio de la variedad Picual de 12 SDF, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

A continuación, se estudió en más detalle la evolución del nivel de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* de olivo en mesocarpio (Fig. 13) y semilla (Fig. 14) de aceituna, que son los tejidos implicados en la obtención y composición final del aceite de oliva. En ambas variedades, el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* en mesocarpio desciende a lo largo del desarrollo y maduración del fruto hasta hacerse prácticamente indetectable, aunque en Picual observamos unos niveles más altos al principio del desarrollo comparado con Arbequina. En semilla, al contrario que en mesocarpio, observamos un ligero aumento en la expresión del gen a lo largo del desarrollo y maduración del fruto.



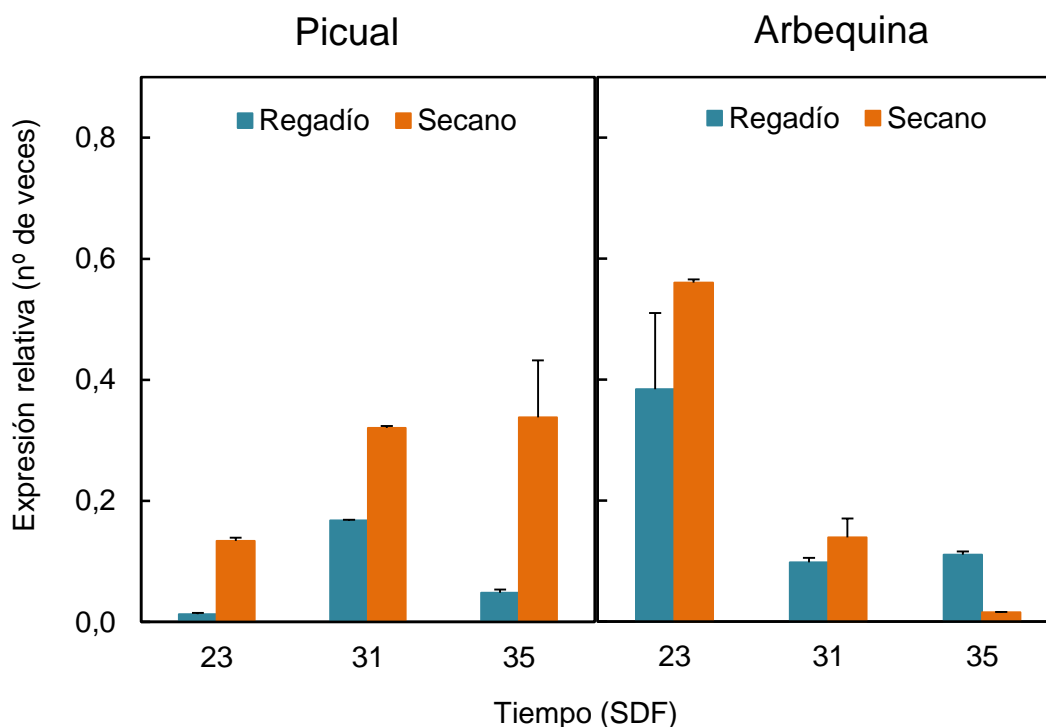
**Figura 13.** Evolución de los niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* en mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina a lo largo del desarrollo y maduración del fruto. A los tiempos indicados, los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* en el mesocarpo de la variedad Picual de 12 SDF, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.



**Figura 14.** Evolución de los niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* en semilla de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina, a lo largo del desarrollo y maduración del fruto. A los tiempos indicados, los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* en el mesocarpio de la variedad Picual de 12 SDF, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

#### IV.2.2. Efecto del régimen hídrico

Para estudiar el efecto del régimen hídrico sobre el gen *Oe3LOX2* se midió su nivel de expresión relativa en mesocarpio de aceitunas de la variedad Picual y Arbequina, cultivadas en regadío y en secano. Como puede observarse en la Figura 15, en ambas variedades se produce un aumento del nivel de transcrito en las aceitunas cultivadas en secano, excepto en el caso de la variedad Arbequina de 35 SDF. En general, se detecta un mayor aumento en los niveles de expresión en la variedad Picual.



**Figura 15.** Efecto del régimen hídrico sobre los niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina. A los tiempos indicados, se determinaron los niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* en el mesocarpio de la variedad Picual de 12 SDF en regadío, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

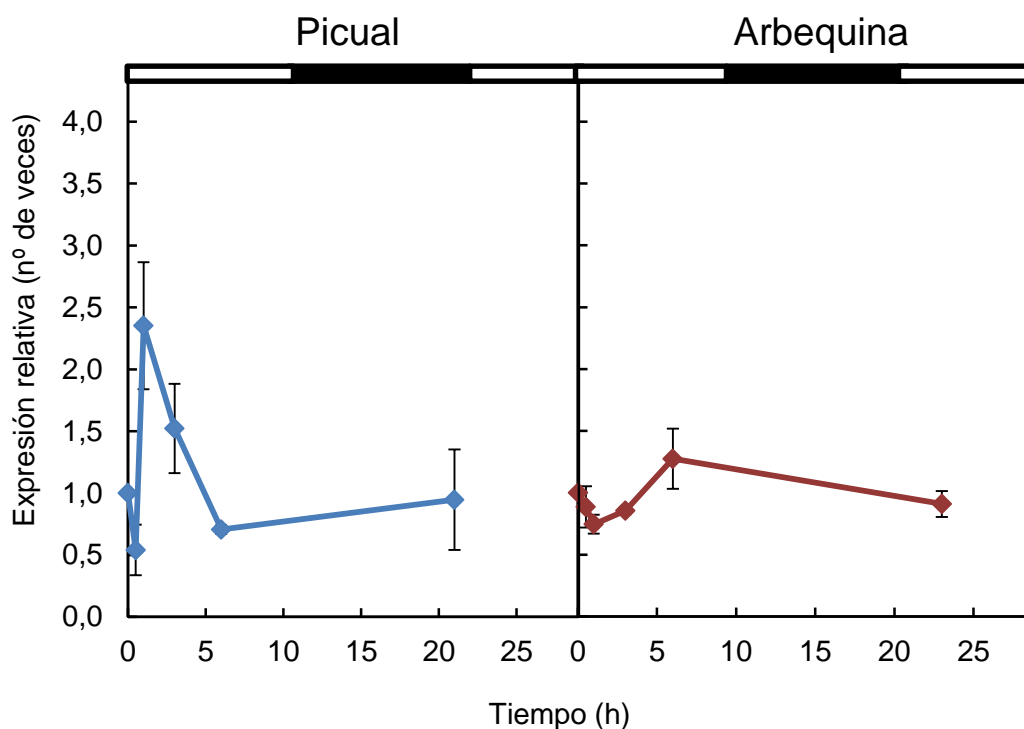
#### IV.2.3. Efecto de distintos estreses abióticos

Para estudiar el efecto de distintos estreses abióticos sobre la formación de compuestos volátiles y la expresión del gen *Oe3LOX2* en aceituna manteniendo las condiciones lo más parecidas posibles a las condiciones fisiológicas en el árbol, se tomaron ramas de olivo de las variedades Picual y Arbequina con aceitunas de 28 SDF y se incubaron durante 24 h, empleando como condiciones estándar 25 °C y un ciclo 12 h luz / 12 h oscuridad, de tal manera que el inicio del experimento se producía a las 2 h del período de luz, manteniéndose el fotoperiodo natural día/noche en las aceitunas. Las condiciones estándar se modificaron en cada caso según el efecto a estudiar, como se indica más adelante. A continuación, se determinaron los niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* mediante qRT-PCR, utilizando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente en el tiempo cero del experimento. Es de destacar que en el experimento control en condiciones estándar no se detectaron cambios en los niveles de

expresión de dicho gen (datos no mostrados), por lo que se consideraron como condiciones control de los efectos estudiados.

#### IV.2.3.1. Efecto de la temperatura

La incubación a temperatura baja (15 °C), manteniendo el resto de las condiciones estándar, produjo un incremento en el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* en el mesocarpo de ambas variedades (Fig. 15), hasta alcanzar un máximo tras 1 h de tratamiento en el caso de Picual y tras 6 h en el caso de Arbequina, para luego descender progresivamente hasta valores iniciales en ambas variedades.

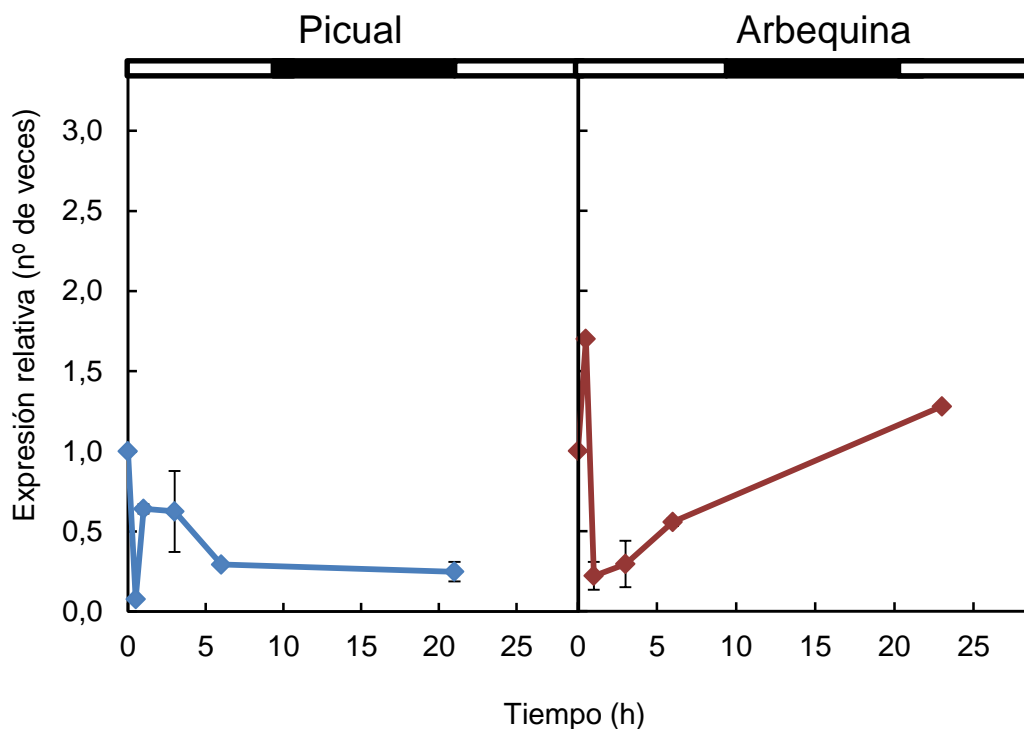


**Figura 16. Efecto de la temperatura baja sobre los niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* en mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina.** Ramas de olivo con aceitunas de 28 SDF se incubaron a 15 °C durante 24 h con un ciclo 12 h luz/12 h oscuridad. A los tiempos indicados se determinaron los niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* en el tiempo cero del experimento, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

El análisis de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* tras la incubación de las ramas de olivo de ambas variedades a 35 °C (Fig. 16) reveló que la temperatura alta



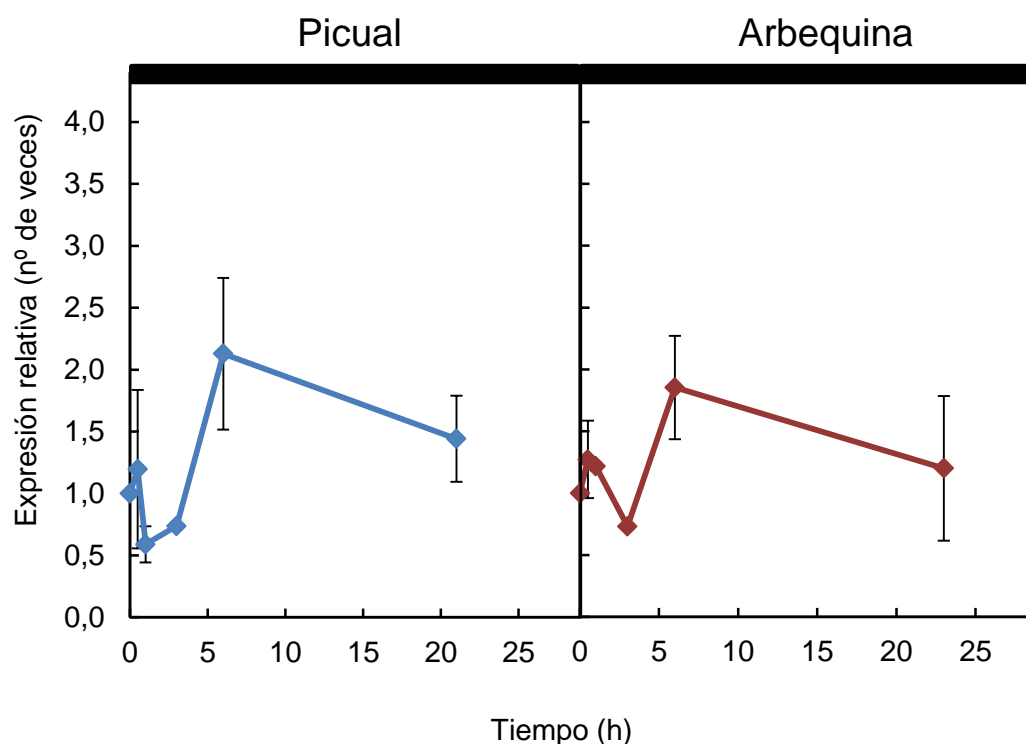
provocaba una rápida disminución en los niveles de expresión relativa de este gen, tanto en Picual como en Arbequina, aunque en esta última variedad se observaba un posterior aumento del nivel de transcrito.



**Figura 17. Efecto de la temperatura alta sobre los niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina.** Ramas de olivo con aceitunas de 28 SDF se incubaron a 35 °C durante 24 h con un ciclo 12 h luz/12 h oscuridad. A los tiempos indicados se determinaron los niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* en el tiempo cero del experimento, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

#### IV.2.3.2. Efecto de la oscuridad

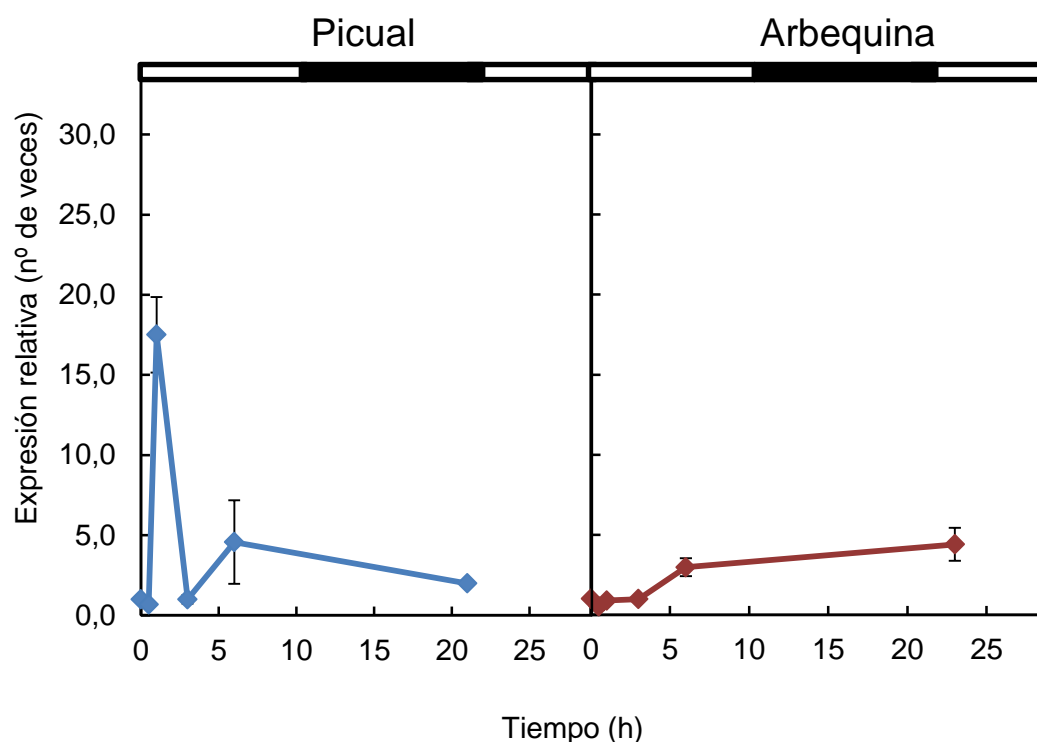
Para estudiar el efecto de la oscuridad sobre los niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* en mesocarpio de aceituna de las variedades Picual y Arbequina, se incubaron ramas de olivo en las condiciones descritas anteriormente, excepto que el experimento se realizó en oscuridad. Se observó el mismo comportamiento en las dos variedades estudiadas (Fig. 17), con un descenso en los niveles de expresión del gen *Oe3LOX2* en las primeras 3 h de tratamiento, produciéndose a continuación un aumento hasta las 6 h y volviendo a descender de manera progresiva hasta situarse de nuevo en los valores iniciales de expresión.



**Figura 18. Efecto de la oscuridad sobre los niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina.** Ramas de olivo con aceitunas de 28 SDF se incubaron a 25 °C durante 24 h en oscuridad. A los tiempos indicados se determinaron los niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* en el tiempo cero del experimento, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

#### IV.2.3.3. Efecto de la herida

Con objeto de estudiar el efecto que provoca la herida en mesocarpio de aceitunas, se incubaron ramas de olivo de las variedades Picual y Arbequina en las condiciones estándar descritas en el inicio de este apartado, provocando daño por herida en el mesocarpio de las aceitunas mediante presión con pinzas planas. En ambas variedades se observó un aumento en los niveles de expresión del gen *Oe3LOX2*, siendo mucho más acusado en la variedad Picual, que alcanzaba un máximo tras 1 h de tratamiento, para luego descender hasta situarse en valores iniciales. En el caso de Arbequina, el aumento de expresión se produjo de forma progresiva durante las 24 h que duró el ensayo.



**Figura 19. Efecto de la herida sobre los niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina.** Ramas de olivo con aceitunas de 28 SDF se incubaron a 25 °C durante 24 h con un ciclo 12 h luz/12h oscuridad, tras provocar en las aceitunas daño por herida mediante presión con pinzas planas. A los tiempos indicados se determinaron los niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* en el tiempo cero del experimento, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

#### IV.3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL OLIVO EN RELACIÓN CON LA FRACCIÓN VOLÁTIL DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Partiendo de una colección nuclear de 36 variedades de olivo (CN-36) (Tab. 7), establecida por Belaj et al. (2012), se llevó a cabo un estudio de la variabilidad de la especie *Olea europaea* que permitiera la selección de variedades con diferencias notables en la fracción volátil del AOV. Para el establecimiento de esta colección nuclear, Belaj et al. (2012) emplearon marcadores moleculares y características agronómicas con objeto de estudiar el patrón de diversidad genética y estructural de las variedades de olivo presentes en el Banco Mundial de Germoplasma de Olivo (BMGO, IFAPA, Centro Alameda del Obispo, Córdoba, España). Como resultado de este estudio se encontró que la colección CN-36 conserva la mayor parte de la diversidad genética

que presente en el BMGO y, por tanto, constituye una herramienta ideal para el estudio de la variabilidad y correlación fenotípica.

**Tabla 7. Variedades de olivo de la colección nuclear CN-36.**

Cultivar	Nº acceso BMGO	País	Área geográfica
Abbadi Abou Gabra	842	Siria	Este
Abou Kanani	840	Siria	Este
Abou Satl Mohazam	1043	Siria	Este
Arbequina	1086	España	Oeste
Barnea	711	Israel	Este
Barri	1026	Siria	Este
Chemlal de Kabilye	118	Argelia	Centro
Dokkar	539	Turquía	Este
Forastera de Tortosa	652	España	Oeste
Frantoio	80	Italia	Centro
Grappolo	181	Italia	Centro
Jabali	1118	Siria	Este
Kalamon	105	Grecia	Centro
Klon-14-1812	1812	Albania	Centro
Koroneiki	218	Grecia	Centro
Leccino	82	Italia	Centro
Llumeta	226	España	Oeste
Maarri	1125	Siria	Este
Majhol-1013	1013	Siria	Este
Majhol-152	152	Siria	Este
Manzanilla de Huerca Overa	757	España	Oeste
Manzanilla de Sevilla	21	España	Oeste
Mari	1143	Iran	Este
Mastoidis	345	Grecia	Centro
Mavreya	699	Grecia	Centro
Megaritiki	108	Grecia	Centro
Menya	669	España	Oeste
Morrut	224	España	Oeste
Myrtolia	700	Grecia	Centro
Picual	9	España	Oeste
Picudo	3	España	Oeste
Piñonera	969	España	Oeste
Shengeh	1141	Iran	Este
Temprano	358	España	Oeste
Uslu	95	Turquía	Este
Verdial de Velez-Málaga-1	51	España	Oeste

La CN-36 mostró un alto grado de variabilidad (Fig. 20 y Tab. 8) en cuanto al contenido de compuestos volátiles del AOV. El grupo de compuestos volátiles más abundante fueron los compuestos de seis átomos de carbono derivados del ácido linolénico (C6/LnA), siendo el rango de variabilidad de estos compuestos de 6,38-40,10 µg/g de aceite. Entre los compuestos C6/LnA, el grupo mayoritario lo constituían los aldehídos, siendo el (*E*)-hex-2-enal el más abundante. El contenido medio de este compuesto fue de 18,52 µg/g de aceite, variando entre 4,92 y 37,64 µg/g de aceite. Estos altos niveles de (*E*)-hex-2-enal, junto con su bajo umbral de detección, le convierten en uno de los principales compuestos que contribuyen al aroma del aceite de oliva.

El segundo grupo de compuestos más abundantes fueron los compuestos de cinco átomos de carbono derivados del ácido linolénico (C5/LnA), principalmente los dímeros de penteno que representaban un 79 % del total de C5/LnA, aunque su contribución al aroma del AOV es baja debido al umbral de detección de estos compuestos. No obstante, el resto de compuestos englobados en este grupo sí tienen una notable contribución en el aroma del AOV, destacando la pent-1-en-3-ona y el pent-1-en-3-ol, que contribuyen de manera notable al aroma dado los bajos umbrales de detección que poseen. En todas las variedades de la CN-36 analizadas se encontraron niveles de pent-1-en-3-ona por encima de su umbral de detección (0,73 ng/g de aceite). El aroma de este compuesto se describe como verde picante y se considera que proporciona una sensación desagradable en el AOV; por el contrario, los pent-2-en-1-ols proporcionan notas de olor verde afrutadas, la percepción básica típica del AOV, que recuerda a la aceituna fresca y sana cosechada en la etapa de maduración óptima. La mayoría de los aceites obtenidos de la CN-36 presentaron niveles de (*E*)-pent-2-en-1-ol por debajo de su umbral de detección, lo que sugiere que este compuesto es poco significativo para el aroma del AOV; sin embargo, todos presentaron concentraciones de (*E*)-pent-2-en-1-ol por encima de su umbral de detección.

El contenido en ésteres sintetizados a través de la ruta LOX presente en los aceites de las variedades CN-36 osciló entre 29 y 8414 ng/g de aceite, y mostró un valor medio de 1447 ng/g de aceite. La presencia de ésteres en la fracción volátil del AOV es muy importante porque son los responsables de las notas afrutadas del aceite. Entre los ésteres LOX, el contenido de acetato de hexilo y acetato de (*E*)-hex-2-en-1-ilo tan sólo fue relevante para el aroma en unas pocas variedades incluidas en la CN-36 dado sus

valores de UAO (Unidades Activas de Olor) superiores a 1. Sin embargo, el acetato de (Z)-hex-3-en-1-ilo parece ser un compuesto importante para el aroma de los aceites obtenidos en alrededor del 61% de las variedades estudiadas.

Los aceites obtenidos presentaron también un contenido significativo en terpenos, aunque bajo, siendo el limoneno el mayoritario, con unos valores que oscilaron entre 0 y 336 ng/g de aceite, con un valor medio de 54 ng/g de aceite. Los terpenos no parece ser un tipo de compuestos que contribuya de manera importante al aroma del AOV dado que prácticamente la totalidad de variedades de la CN-36 presentaban valores de  $UAO < 1$ .

Los compuestos volátiles que derivan del metabolismo de aminoácidos (BC), mostraron contenidos bajos en los aceites estudiados, con un valor medio de 112 ng/g de aceite y un rango de variabilidad de 39-521 ng/g de aceite. Sin embargo, podrían tener un papel relevante en el aroma de los aceites en función de las unidades UAO que presentaban, especialmente los aldehídos 2 y 3-metil-butanal. Por el contrario, el 2-metil-butan-1-ol presenta contenidos por debajo de su umbral de detección ( $UAO > 1$ ) en los aceites de todas las variedades de la CN-36.

Para estudiar la relación entre los principales grupos de compuestos volátiles se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson. Como se esperaba, el contenido total de compuestos volátiles en los aceites presentaba una correlación significativa con el principal grupo de compuestos volátiles (C6). Destacable es la fuerte correlación significativa con los aldehídos C6/LnA ( $r=0,91$ ). El resto de grupos C6 mostraron una significativa, pero moderada, correlación ( $r=0,35$ ,  $0,46$  y  $0,32$ ). Por el contrario, la mayoría de compuestos C5 mostraron un bajo coeficiente de correlación excepto para los dímeros de penteno que presentaron un nivel de correlación moderado ( $r=0,38$ ) con el total de compuestos volátiles.

A pesar de la significativa contribución de los ésteres LOX y los aldehídos BC sobre el aroma del AOV, su coeficiente de correlación en relación con el contenido total de volátiles es bajo. Realmente, no se han encontrado correlaciones altas con ningún otro grupo de compuestos. Los compuestos BC no comparten ninguna ruta biosintética con el resto de compuestos volátiles, por lo que estos resultados son lógicos desde un punto de vista metabólico, sin embargo, esto no explica el coeficiente de correlación de los ésteres LOX. Se observaron niveles de correlación moderados entre los ésteres LOX

y los alcoholes C6/LA ( $r=0,42$ ), sin embargo, el nivel de correlación observado con sus precursores, los alcoholes C6/LnA fue mucho menor ( $r=0,23$ ). Por otra parte, se encontró un alto nivel de correlación entre alcoholes C6/LnA y C6/LA ( $r=0,73$ ), sugiriendo que presentan el mismo origen bioquímico. Sin embargo, se observó una débil correlación entre el contenido de aldehídos C6/LnA y sus productos metabólicos, los alcoholes C6/LnA ( $r=0,15$ ). Este bajo nivel de correlación también se observó para el contenido de aldehídos C6/LA y los alcoholes C6/LA ( $r=0,39$ ).

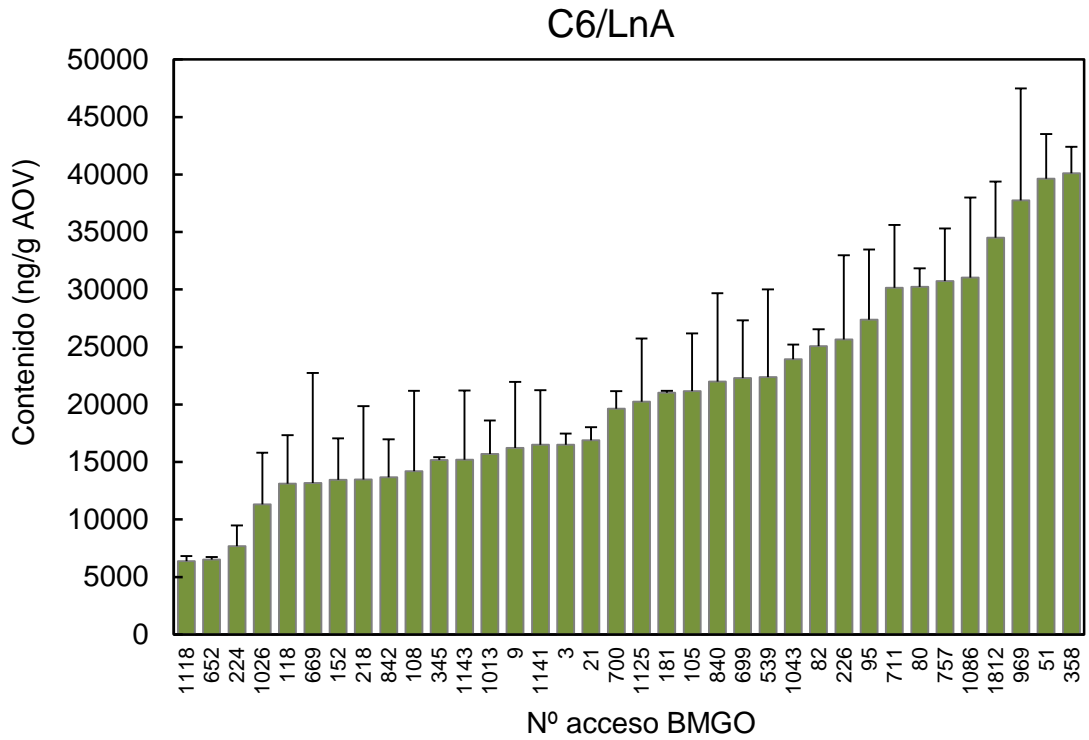
Por último, se observó un significativo pero débil nivel de correlación entre los carbonilos C5/LnA y los alcoholes C5/LnA ( $r=0,36$ ), bastante similar al encontrado para cada uno de estos grupos de compuestos con el contenido en dímeros de penteno ( $r=0,50$  y  $0,29$ , respectivamente).

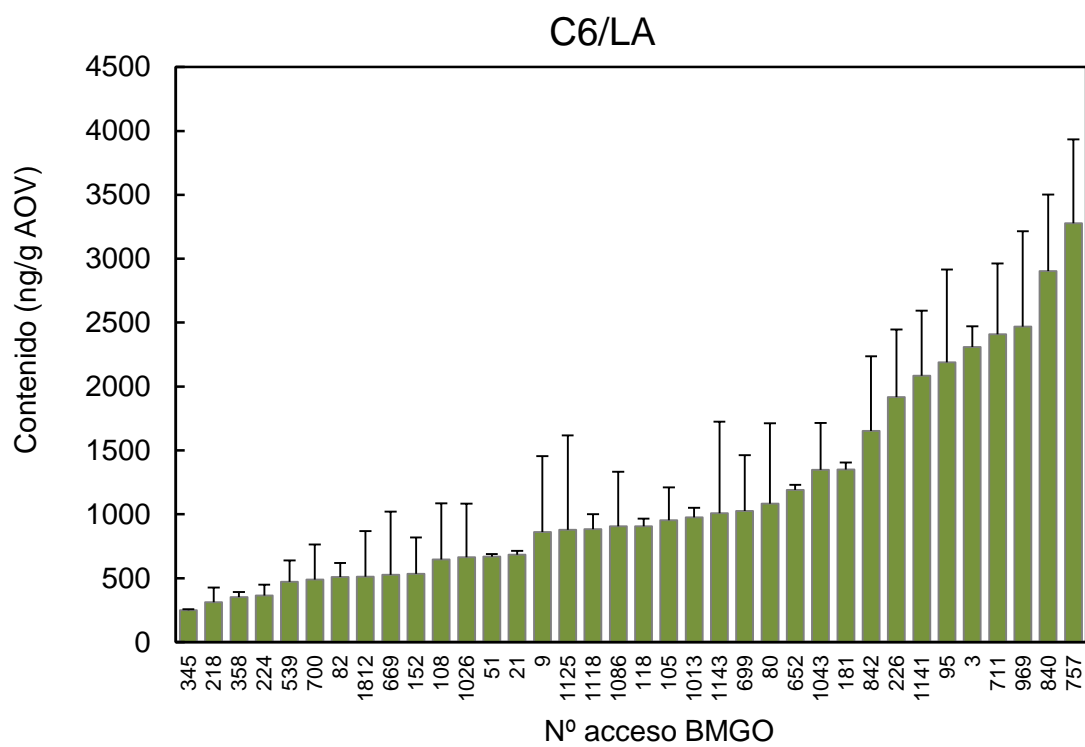
**Tabla 8. Variabilidad y distribución del contenido de volátiles (ng/g de aceite) en los aceites procedentes de la CN-36 del BMGO.** Los frutos fueron recogidos en el envero de forma manual entre los años 2008 y 2012. Los compuestos volátiles se analizaron según se indica en Materiales y Métodos. \*Umbrales de detección estimados a partir de isómeros (Hatanaka et al., 1992) o compuestos estructuralmente similares (Evans et al., 1971; Takeoka et al., 1990).

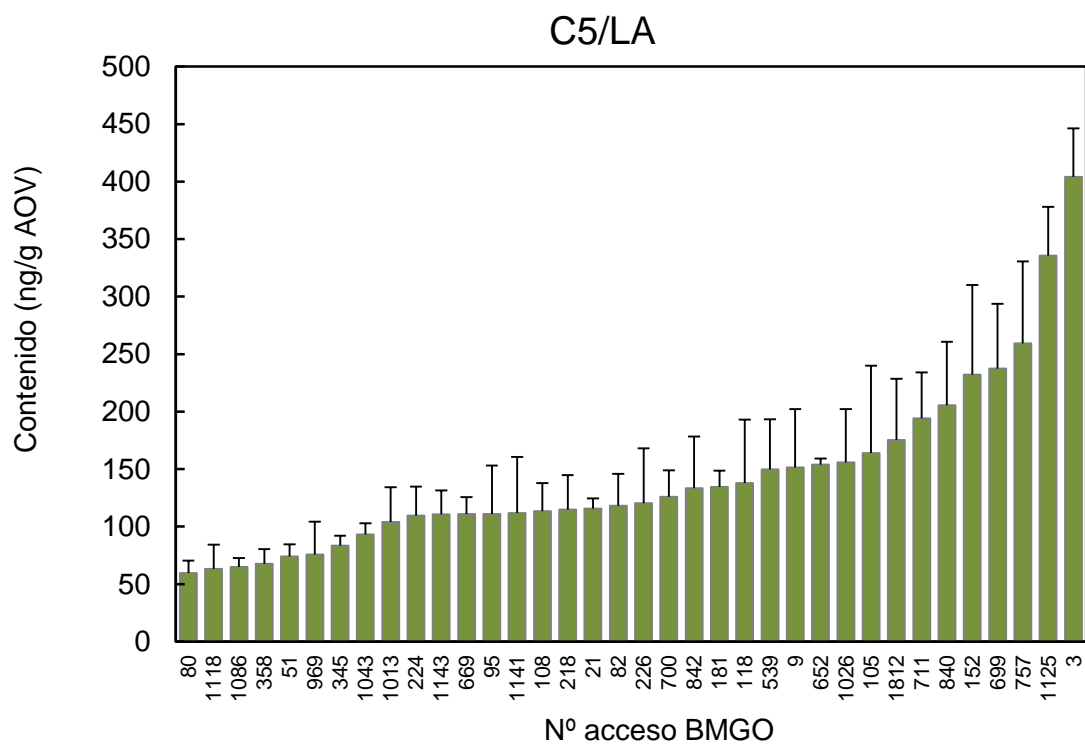
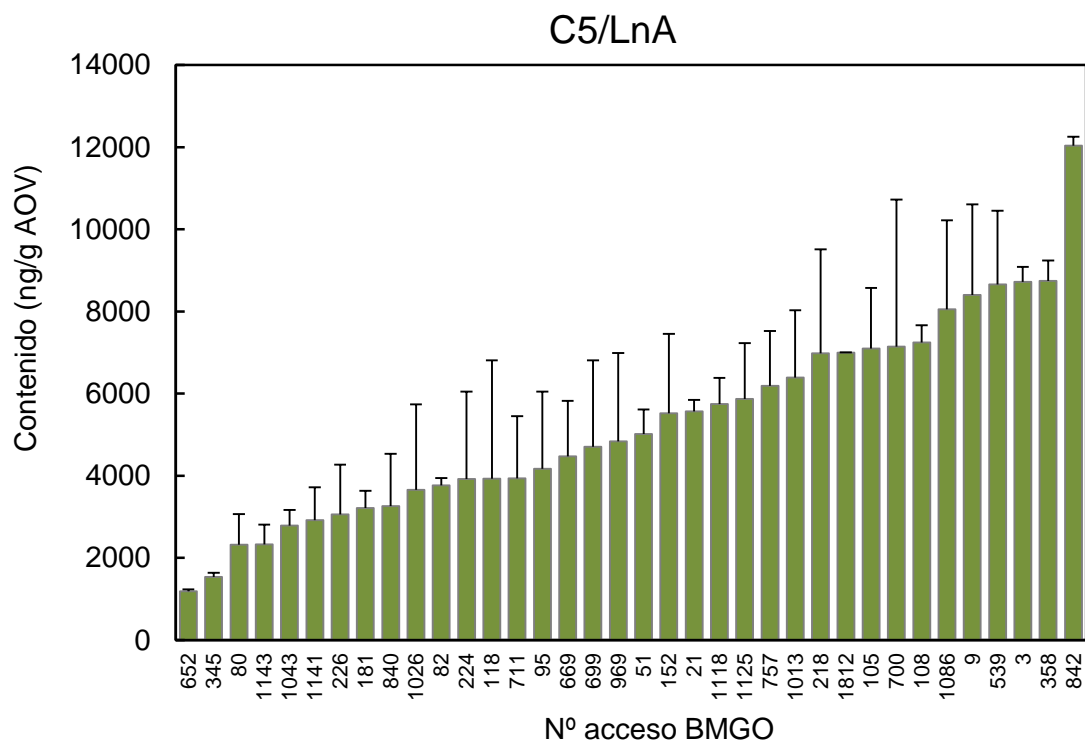
Grupo	Subgrupo	Compuesto	Código	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	Variedad UAO >1	Umbral de detección (ng/g de aceite)	Referencias
C6/LnA	Aldehídos C6/LnA	(E)-hex-3-enal	6C-1	78	581	236	194	3	450	(Grosch, 1994)
		(Z)-hex-3-enal	6C-2	52	2180	589	395	36	1,7	(Reiners y Grosch, 1998)
		(Z)-hex-2-enal	6C-3	175	1059	587	622	28	*424	(Hatanaka et al., 1992; Reiners y Grosch, 1998)
		(E)-hex-2-enal	6C-4	4916	37643	18518	16443	36	424	(Reiners y Grosch, 1998)
	Alcoholes C6/LnA	(E)-hex-3-enol	6C-5	4	105	29	20	0	1500	(Aparicio et al., 2000)
		(Z)-hex-3-enol	6C-6	72	4306	571	402	3	1100	(Reiners y Grosch, 1998)
		(E)-hex-2-enol	6C-7	39	559	211	175	0	5000	(Aparicio y Luna, 2002)
C6/LA	Aldehído C6/LA	hexanal	6C-8	195	2175	809	684	36	300	(Reiners y Grosch, 1998)
	Alcohol C6/LA	hexan-1-ol	6C-9	39	1740	361	183	7	400	(Aparicio et al., 2000)
C5/LnA	Carbonilos C5/LnA	pent-1-en-3-ona	5C-1	68	1020	425	358	36	0,73	(Reiners y Grosch, 1998)
		(Z)-pent-2-enal	5C-2	4	78	24	20	0	*300	(Aparicio y Luna, 2002; Hatanaka et al., 1992)
		(E)-pent-2-enal	5C-3	22	184	73	61	0	300	(Aparicio y Luna, 2002)
	Alcoholes C5/LnA	pent-1-en-3-ol	5C-4	29	339	157	155	0	400	(Flath et al., 1973)
		(Z)-pent-2-en-1-ol	5C-5	14	730	111	45	4	250	(Tura et al., 2008)
		(E)-pent-2-en-1-ol	5C-6	98	1085	336	281	36	*250	(Hatanaka et al., 1992; Tura et al., 2008)
	Dímeros de penteno	dímero de penteno-1	5C-7	32	583	266	243	0	*13500	(Evans et al., 1971)
		dímero de penteno-2	5C-8	33	461	213	197	0	*13500	(Evans et al., 1971)
		dímero de penteno-3	5C-9	135	1978	950	890	0	*13500	(Evans et al., 1971)
		dímero de penteno-4	5C-10	127	2892	1066	1017	0	*13500	(Evans et al., 1971)
		dímero de penteno-5	5C-11	34	1599	375	325	0	*13500	(Evans et al., 1971)
		dímero de penteno-6	5C-12	37	1676	723	698	0	*13500	(Evans et al., 1971)
		dímero de penteno-7	5C-13	68	1789	569	524	0	*13500	(Evans et al., 1971)
C5/LA	Carbonilos C5/LA	pentan-3-ona	5C-14	18	335	79	71	0	7000	(Morales et al., 1995)
		pentanal	5C-15	9	197	52	40	0	240	(Aparicio y Luna, 2002)
	Alcohol C5/LA	pentan-1-ol	5C-16	3	46	13	11	0	470	(Morales y Aparicio, 1999)
Ésteres	Ésteres LOX	acetato de hexilo	E-1	8	4390	513	113	5	1040	(Morales y Aparicio, 1999)
		acetato de (E)-hex-2-en-1-ilo	E-2	14	1876	131	39	3	*200	(Hatanaka et al., 1992; Reiners y Grosch, 1998)
		acetato de (Z)-hex-2-en-1-ilo	E-3	0	5285	876	253	22	200	(Reiners y Grosch, 1998)
	Ésteres no LOX	acetato de metilo	E-4	5	30	15	15	0	200	(Kalua et al., 2006)
		acetato de etilo	E-5	4	94	20	13	0	940	(Aparicio y Luna, 2002)
		hexanoato de metilo	E-6	6	282	35	22	0	*520	(Takeoka et al., 1990)
		hexanoato de etilo	E-7	8	78	27	21	0	*520	(Takeoka et al., 1990)
BC	Aldehídos	3-metil-butanal	BC-1	9	263	41	30	36	5,4	(Reiners y Grosch, 1998)
		2-metil-butanal	BC-2	7	182	29	17	36	5,2	(Reiners y Grosch, 1998)
	Alcohol	2-metil-butan-1-ol	BC-3	7	146	33	23	0	480	(Aparicio y Luna, 2002)
Terpenos		limoneno	T-1	0	336	54	40	1	250	(Fedeli, 1977)

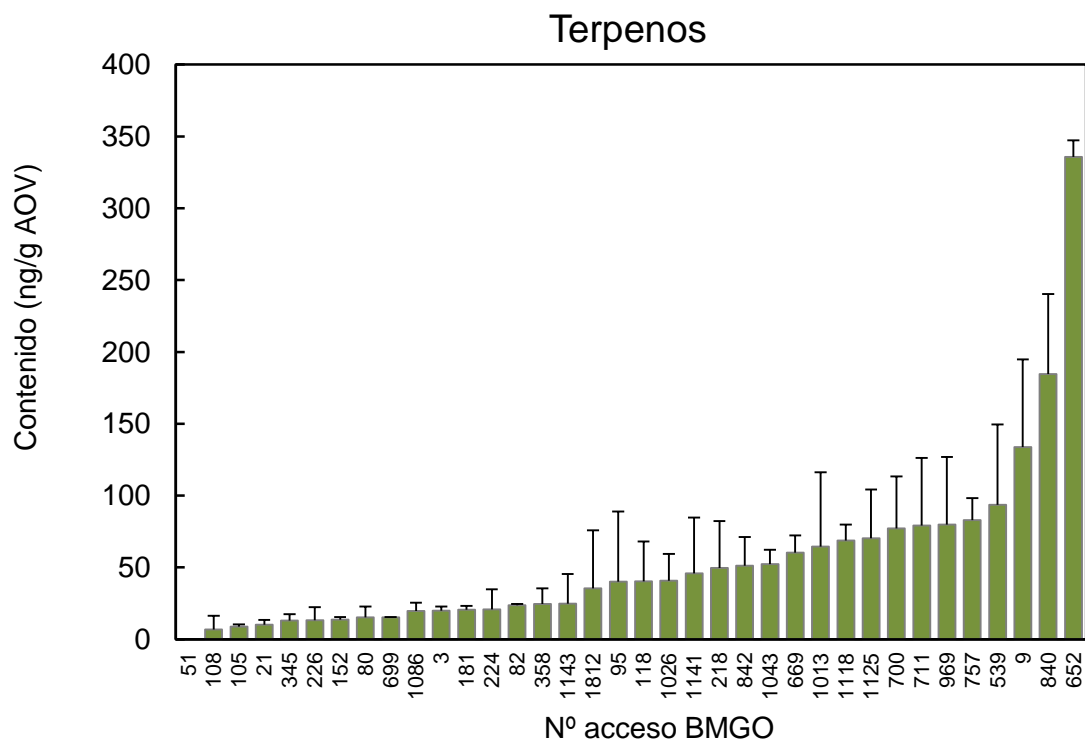
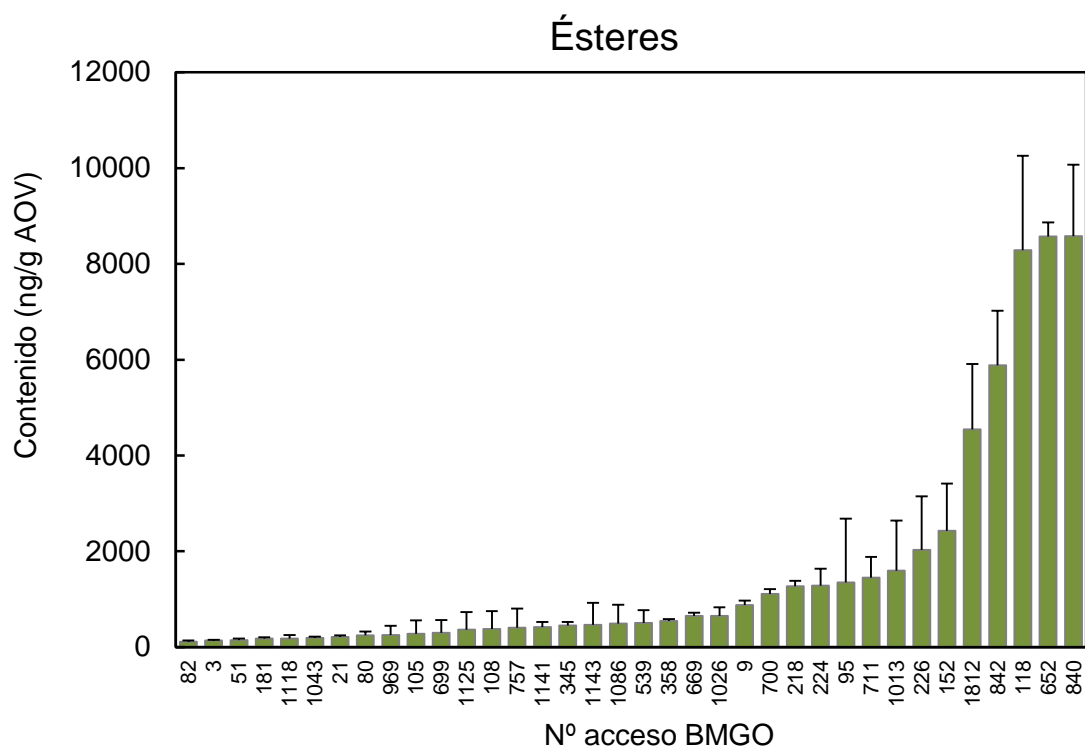


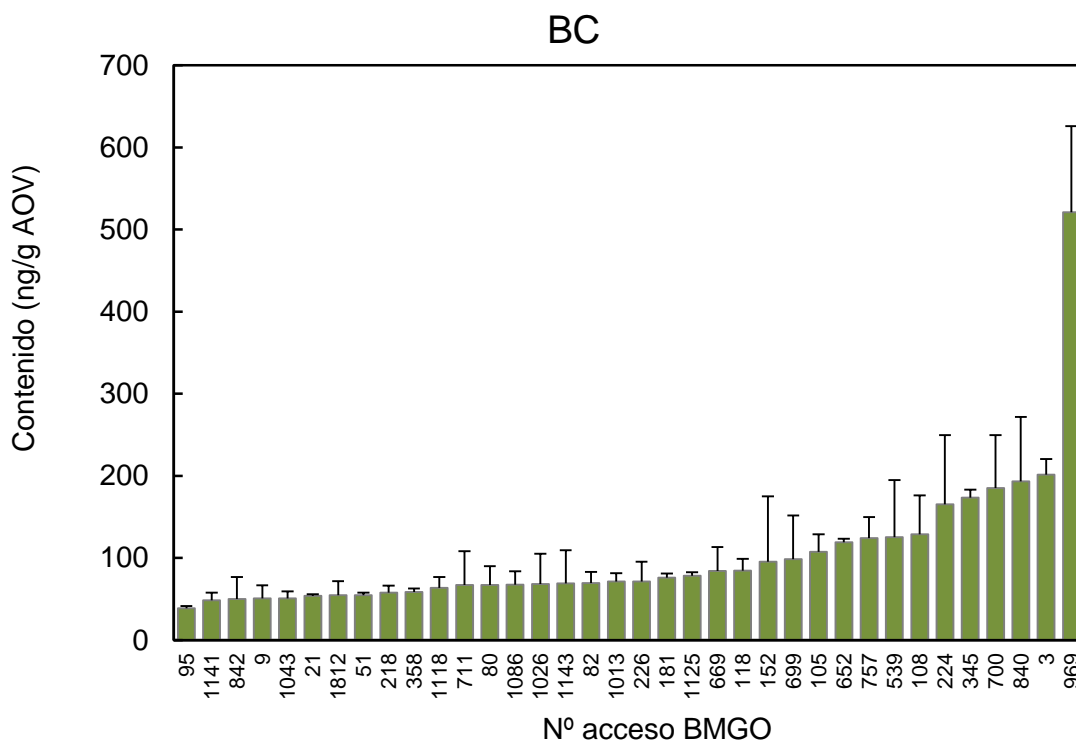
Las variedades que presentaron los niveles más altos de compuestos volátiles fueron Abou Kanani, Klon-14 y Piñonera, aunque en esta última se observaron grandes fluctuaciones entre las diferentes campañas. Por el contrario, las que presentaban los niveles más bajos son las variedades Jabali y Morrut.











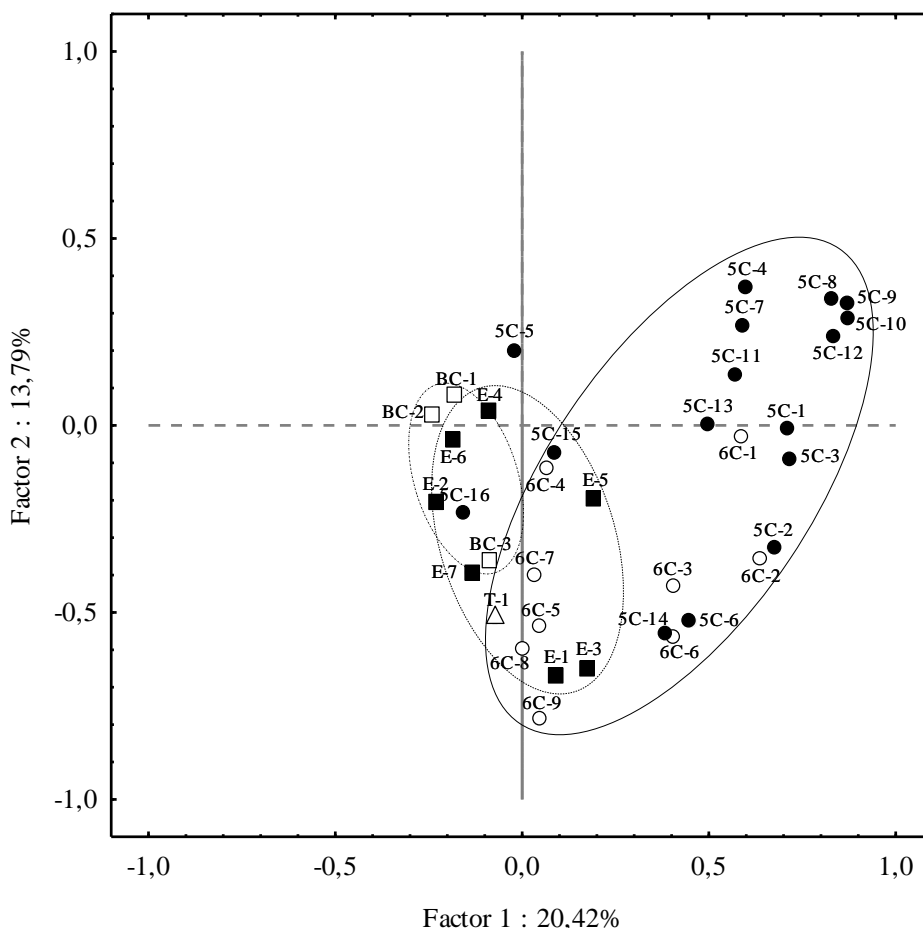
**Figura 20. Variabilidad del perfil metabólico de las variedades de la CN-36 analizadas.** Los frutos fueron recogidos en el envero de forma manual entre los años 2008 y 2012. Los compuestos volátiles se analizaron según se indica en Materiales y Métodos.

Para explicar la relación entre los distintos grupos de compuestos volátiles en los aceites procedentes de la CN-36, se diseñó un análisis de componentes principales (ACP) (Fig. 21). El primero de los dos componentes principales explica el 34,21 % de varianza, 20,42 % para el CP1 y 13,79 % para CP2. Los aldehídos C6 y los compuestos C5 derivados del LnA se agrupaban juntos en el primer y cuarto cuadrante, y sus varianzas se explican principalmente por el CP2. Los isómeros (*Z*)-pent-2-en-1-ol (5C-5) y (*E*)-pent-2-en-1-ol (5C-6) están notablemente separados en el gráfico, indicando que probablemente tengan diferentes orígenes. De acuerdo con el agrupamiento, (*E*)-pent-2-en-1-ol podría tener un origen bioquímico, sintetizado a través de la ruta LOX (rama homolítica), sin embargo el origen de (*Z*)-pent-2-en-1-ol es desconocido. Los compuestos C6 (6C-8, 6C-9) y el alcohol C5 (pentan-1-ol, 5C-16) derivados del LA se encuentran separados de los aldehídos C6 y compuestos C5 derivados del LnA. La síntesis de estos compuestos podría atribuirse a una mezcla de procesos de oxidación químicos y bioquímicos, los últimos a través de la ruta LOX.

Los alcoholes C6 derivados tanto del LA como del LnA se agrupan a lo largo del eje negativo del CP2, claramente distanciados del resto de compuestos sintetizados por

la ruta LOX (Fig. 21). Los ésteres se encontraban agrupados a lo largo del eje negativo del CP2, solapando el espacio de sus precursores metabólicos sintetizados a través de la ruta LOX.

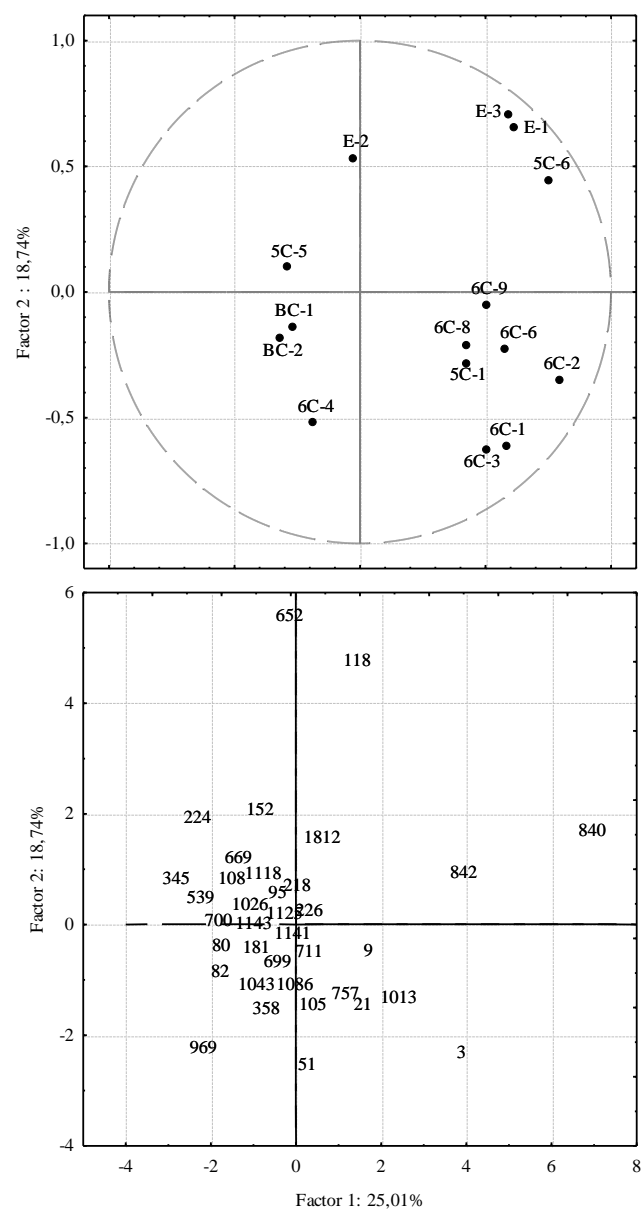
Los compuestos BC se agruparon lejos del resto de compuestos sintetizados por la ruta LOX, indicativo de un origen metabólico diferente.



**Figura 21. Distribución vectorial de los principales compuestos volátiles presentes en los aceites de las variedades de la CN-36.**

Entre los principales compuestos volátiles presentes en los aceites de las variedades CN-36, sólo algunos tienen UAO mayores de uno, por lo que teóricamente, sólo ellos contribuyen al aroma del aceite (Tab. 8). En este sentido, se llevó a cabo otro ACP tomando como variables sólo aquellos compuestos volátiles que presentan  $UAO > 1$  en al menos el 5 % de las variedades estudiada (Fig. 22). Excepto el hexan-1-ol (6C-9) y la pent-1-en-3-ona (5C-1), la mayoría de los compuestos volátiles contribuyen de manera positiva en el aroma de los aceites. Como muestra la Figura 22, los dos primeros CP

explican el 44 % del total de varianza. La distribución vectorial de los compuestos volátiles distingue áreas de compuestos que contribuyen de manera positiva y aquellos que lo hacen de manera negativa. Además, aquellas variedades que producen aceites con un contenido elevado en ésteres afrutados se localizan en el primer cuadrante de la gráfica, mientras que las variedades con un alto contenido en (E)-hex-2-enal (6C-4) se sitúan en el tercer cuadrante así como aquellas que presentan elevadas concentraciones de aldehídos derivados de aminoácidos (BC-1 y BC-2), responsables de las notas verde afrutadas de los aceites (Aparicio et al., 1996). Por el contrario, las variedades cuyos aceites presentaban contenidos elevados de hexan-1-ol (6C-9) y pent-1-en-3-ona (5C-1) se localizaban a lo largo de la bisectriz del cuarto cuadrante.



**Figura 22. Distribución vectorial de compuestos volátiles seleccionados por su contribución al aroma (UAO > 1) en los aceites de las variedades de la CN-36. (A) Distribución vectorial de los compuestos volátiles. El código de cada compuesto está enumerado en la Tabla 8; (B) distribución de las variedades CN-36. Las referencias de las variedades están enumeradas en la Tabla 7.**



#### **IV.4. ESTUDIO METABÓLICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA BIOSÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DEL ACEITE EN LINEAS DE OLIVO SELECCIONADAS CON DIFERENTE FONDO GENÉTICO (VARIEDADES)**

A partir del estudio del perfil metabólico de los compuestos volátiles del aceite realizado en las variedades de la CN-36, se seleccionaron siete variedades de olivo para un seguimiento de su evolución durante el proceso de maduración del fruto (Tab. 9). Éstas se seleccionaron en función del contenido total de compuestos en la fracción volátil de los aceites, la presencia de niveles altos de ésteres entre ellos, y el comportamiento productivo.

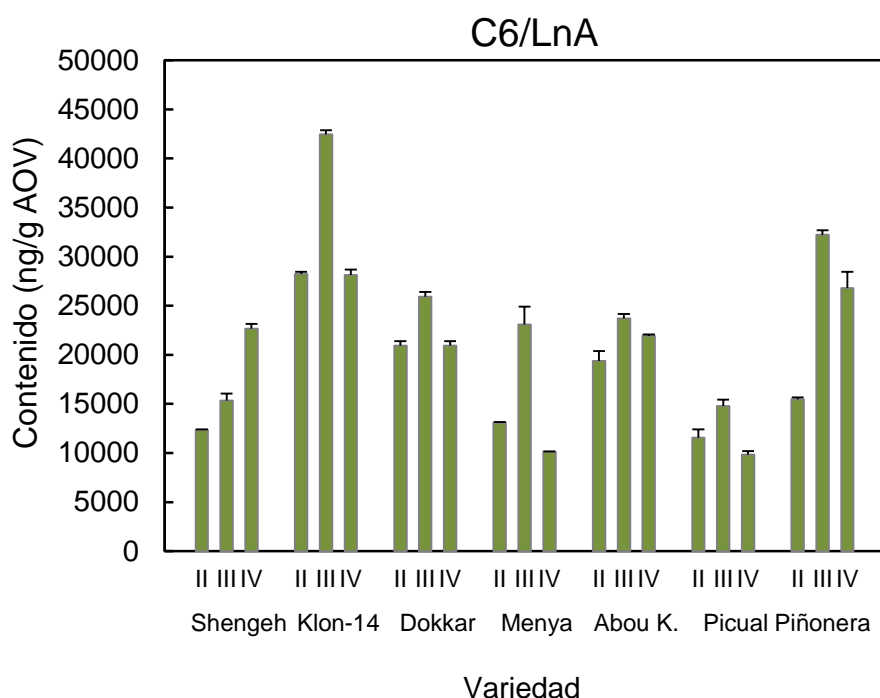
**Tabla 9. Variedades seleccionadas a partir del estudio de la CN-36 para seguimiento de su evolución durante el proceso de maduración del fruto.**

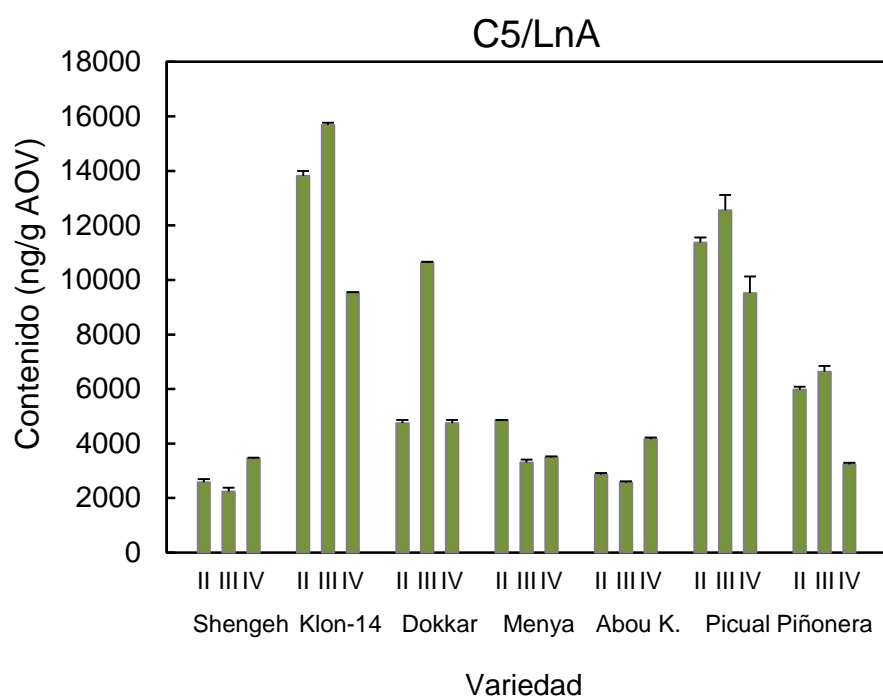
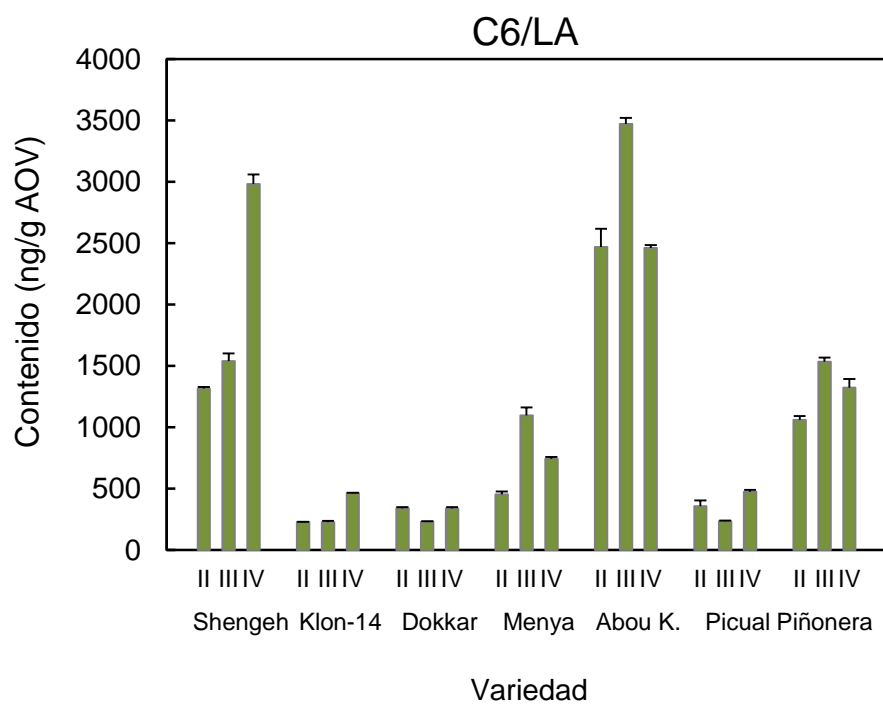
Variedad	Características
Piñonera	Alto contenido en compuestos volátiles
Klon-14	Alto contenido en compuestos volátiles (alto en ésteres LOX)
Abou Kanani	Contenido medio en compuestos volátiles (alto en ésteres LOX)
Picual	Contenido medio en compuestos volátiles
Dokkar	Contenido medio en compuestos volátiles
Menya	Bajo contenido en compuestos volátiles (relativamente alto en ésteres LOX)
Shengeh	Bajo contenido en compuestos volátiles

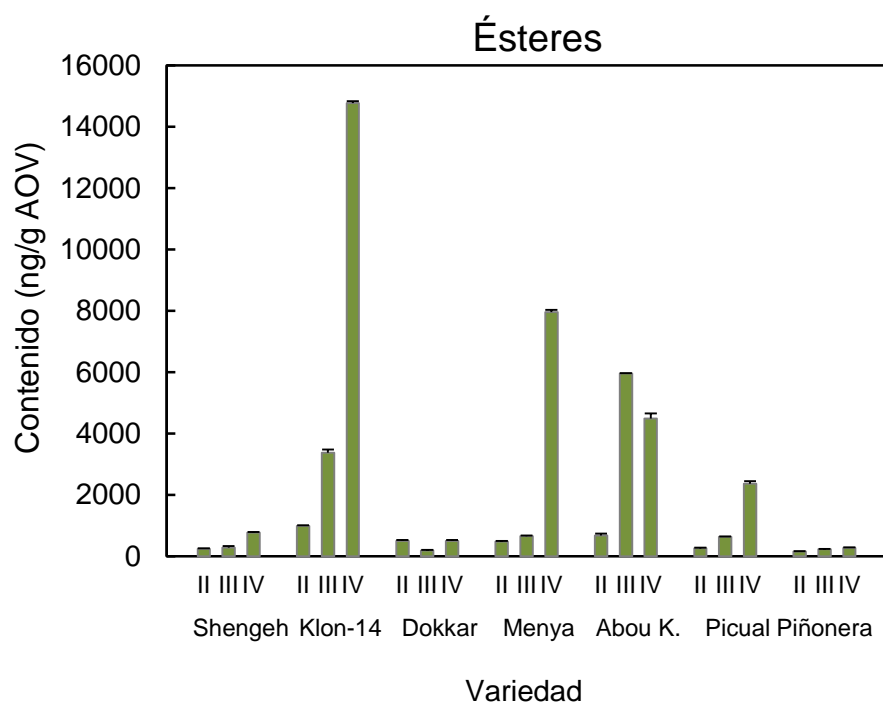
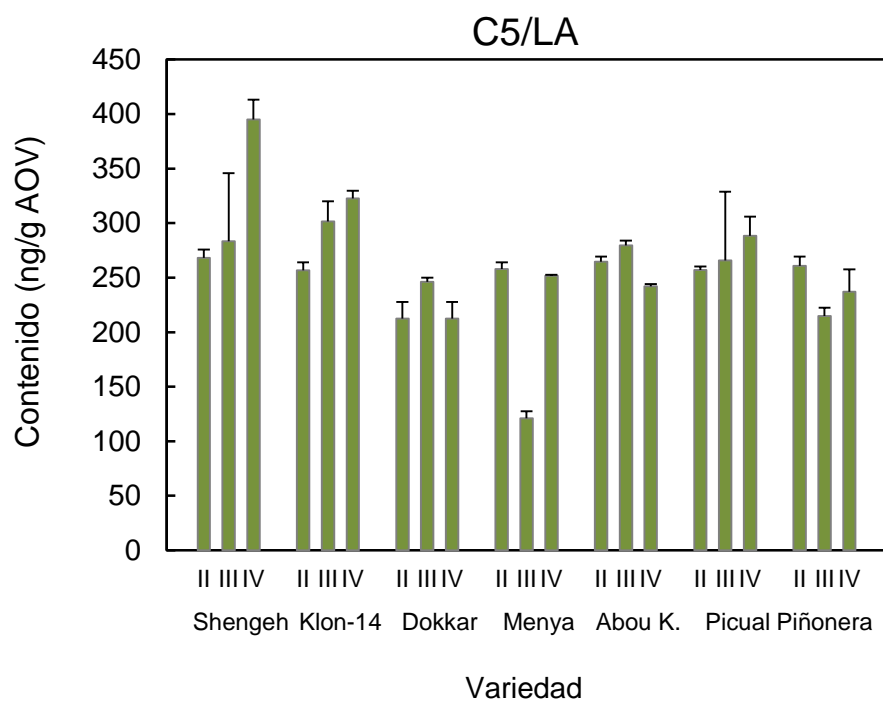
##### **IV.4.1. Análisis de los compuestos volátiles del aceite de las variedades seleccionadas de la colección CN-36**

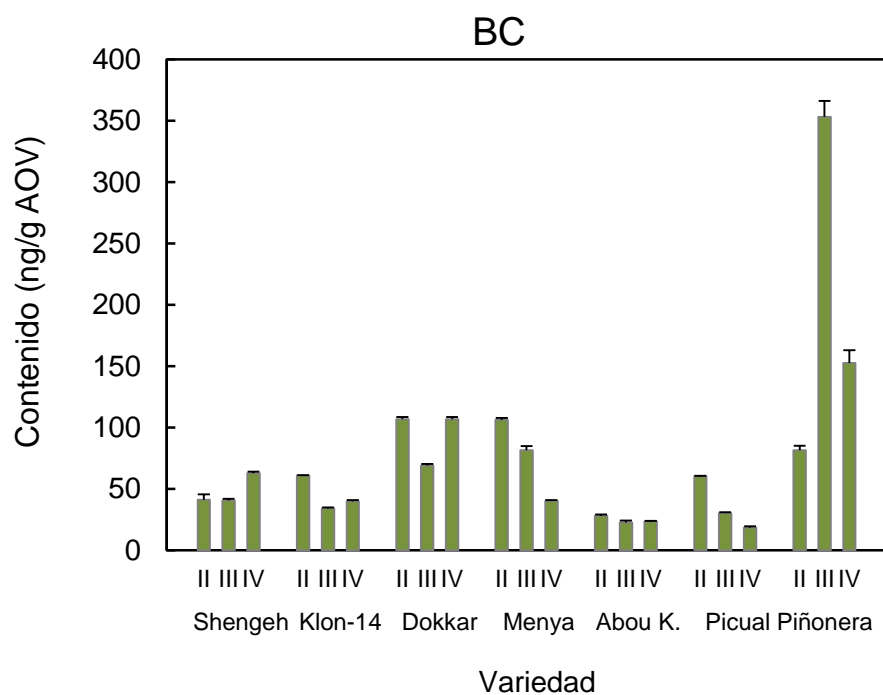
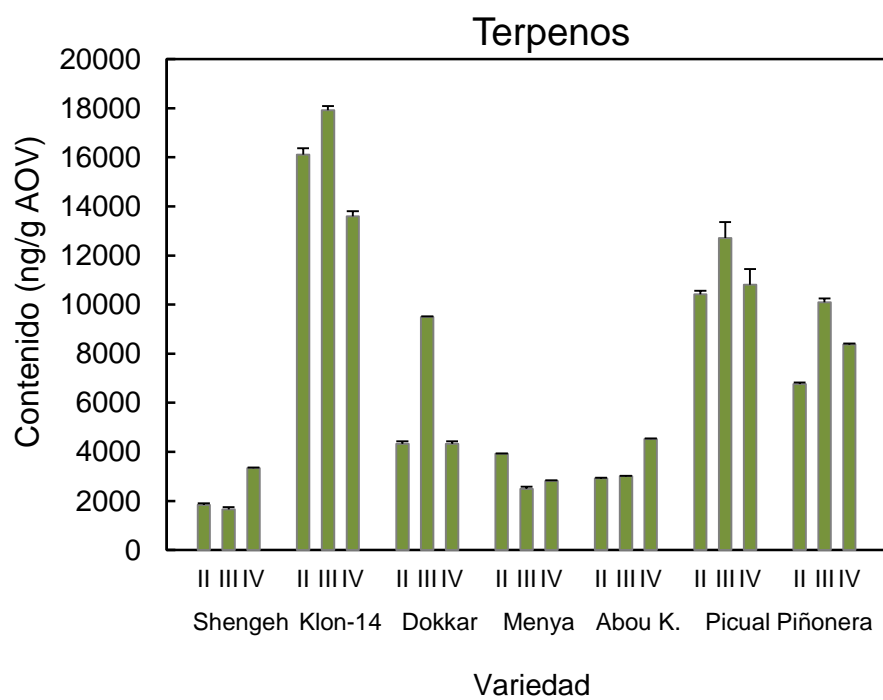
Se realizó el análisis de compuestos volátiles del aceite de las siete variedades seleccionadas, a lo largo del proceso de maduración. Como se ha comentado en Materiales y Métodos, se establecieron cuatro estadios correspondientes a: I, IM=0 (fruto verde); II, IM=1 (fruto verde-amarillo); III, IM=2,5 (envero); IV, IM=5 (fruto maduro). El contenido en compuestos volátiles de los aceites con la contribución de las distintas clases de compuestos se muestra en la Figura 23. Dado el bajo nivel de maduración del fruto en el estadio I no se pudo obtener aceite a partir de él. El contenido en compuestos volátiles presenta en general un máximo cuando el fruto se encuentra en envero (estadio III), con la excepción de la variedad Shengeh que parece experimentar un incremento continuo a lo largo de la maduración del fruto. Sin

embargo, la particular evolución del color de esta variedad hace muy difícil establecer el momento exacto del envero. El mayor contenido total de compuestos volátiles lo presentó la variedad Klon-14 y el menor Menya, lo cual está de acuerdo con los datos previamente obtenidos al analizar la CN-36. Como se puede ver en la Figura 23, tanto la variedad Klon-14 como la variedad Abou Kanani mostraron un alto contenido en ésteres, fundamentalmente ésteres sintetizados a través de la ruta LOX. El aceite de la variedad Piñonera presentó un alto contenido en compuestos volátiles, aunque menor del que se esperaba en un principio. La fracción volátil de esta variedad parece verse muy afectada por las condiciones climáticas dado que presenta oscilaciones muy grandes entre campañas.









**Figura 23. Evolución del contenido de compuestos volátiles en aceites de las variedades CN-36 seleccionadas obtenidos durante el proceso de maduración del fruto. Los compuestos volátiles se analizaron según se indica en Materiales y Métodos.**

#### **IV.4.2. Niveles de actividad de las enzimas de la ruta LOX de las variedades seleccionadas de la CN-36**

Paralelamente al seguimiento del contenido de compuestos volátiles en las variedades de la CN-36 seleccionadas, se llevó a cabo la determinación en el fruto de las actividades enzimáticas principales de la ruta de la lipoxigenasa: LOX, HPL, ADH y AAT (Fig. 24).

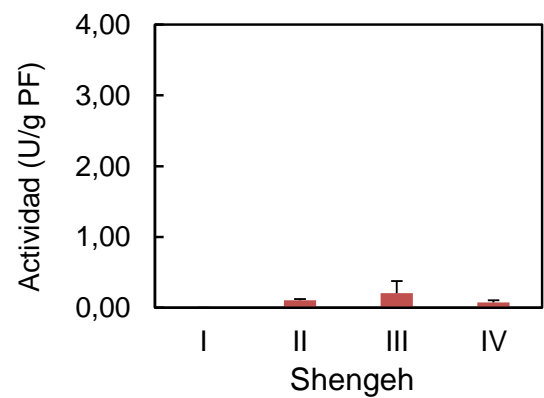
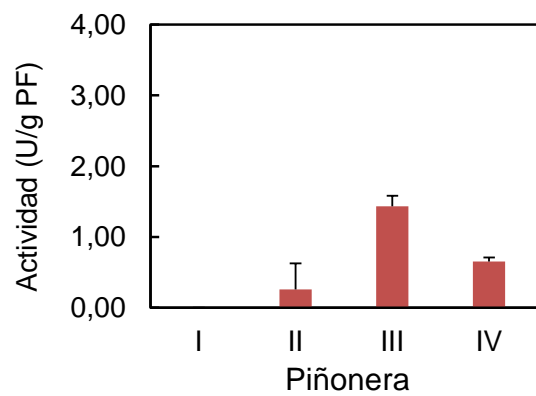
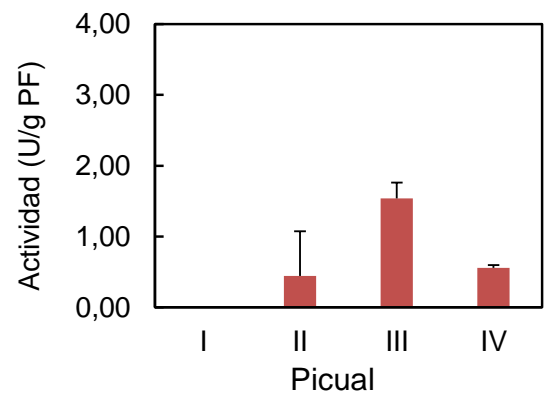
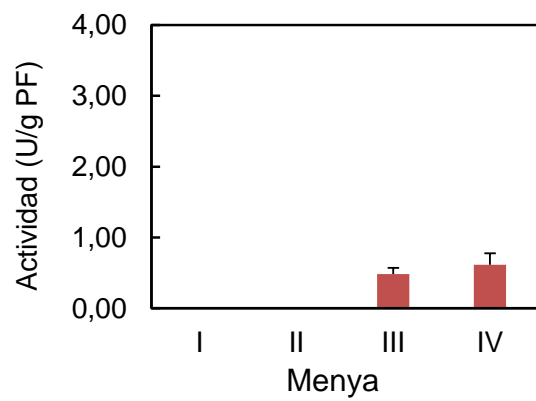
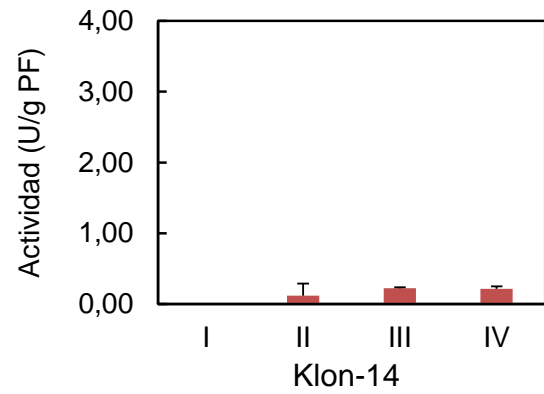
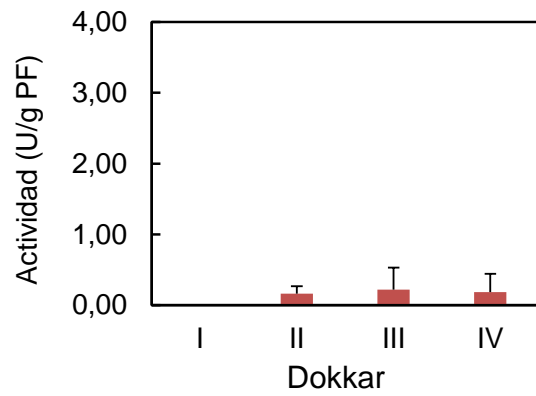
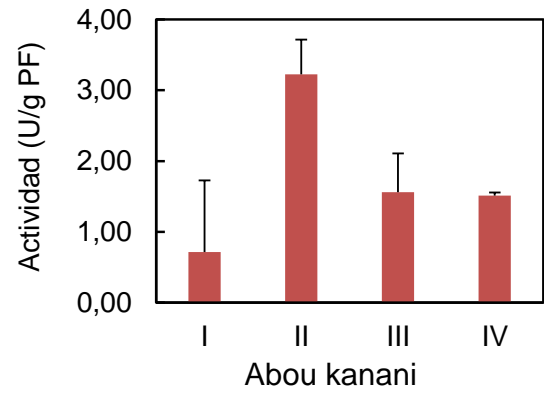
Podemos observar que la actividad LOX varía mucho entre variedades así como también lo hace entre estadios de maduración. Los niveles de actividad más altos se encontraron en aceitunas con alto nivel de maduración, generalmente en los estadios III y IV. Las variedades con mayor actividad LOX fueron Abou Kanani, Piñonera y Picual, mientras que las variedades donde esta actividad fue menor, e incluso indetectable en ciertos estadios de maduración, fueron Dokkar, Klon-14 y Shengeh.

En el caso de la actividad HPL, se observó menos variabilidad que en el caso de la actividad LOX, y no se hallaron grandes diferencias entre variedades. El nivel de esta actividad enzimática a lo largo de la maduración del fruto era prácticamente constante, excepto en el estadio I de las variedades Abou Kanani, Klon-14 y Piñonera, donde se detectó un mayor nivel de actividad HPL.

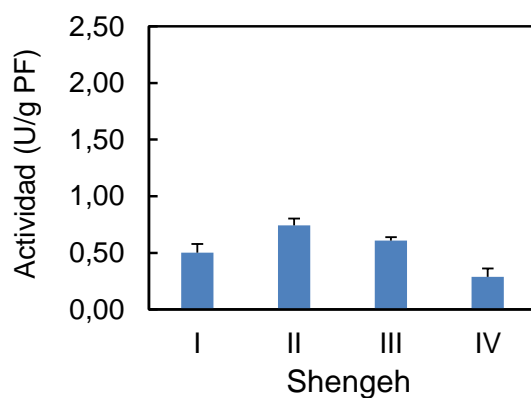
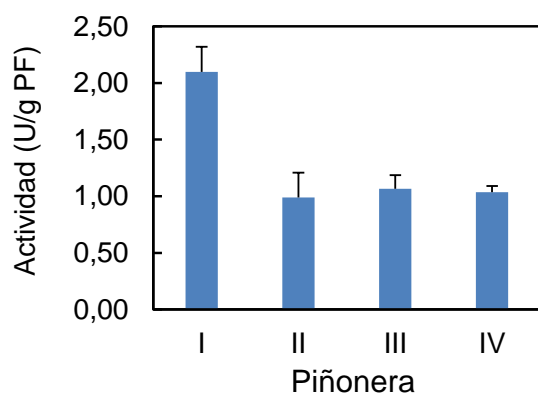
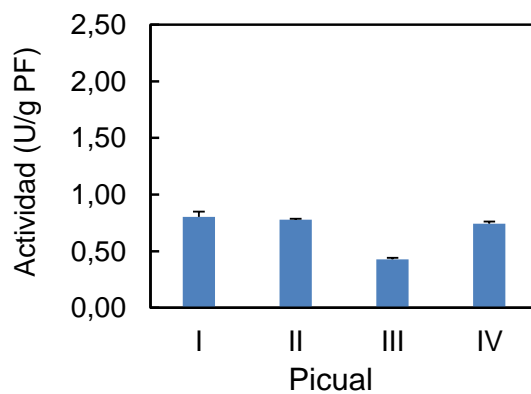
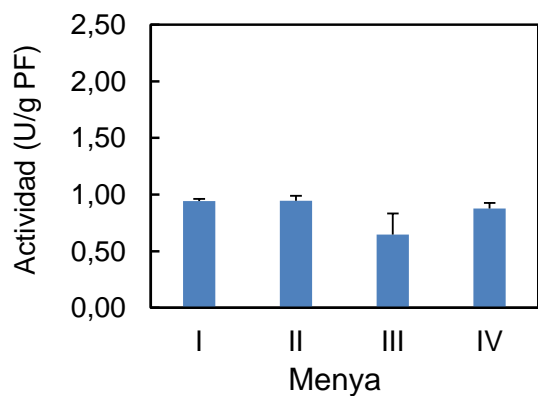
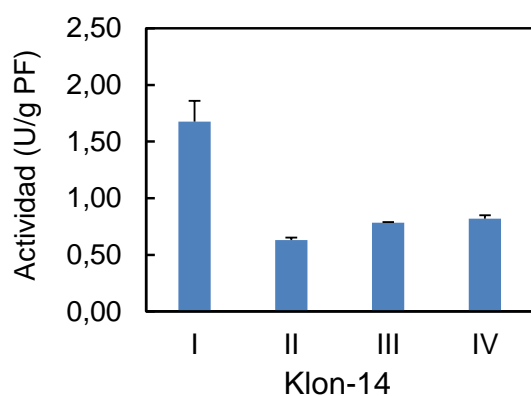
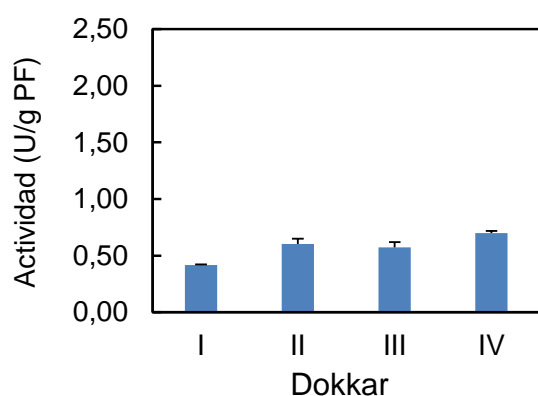
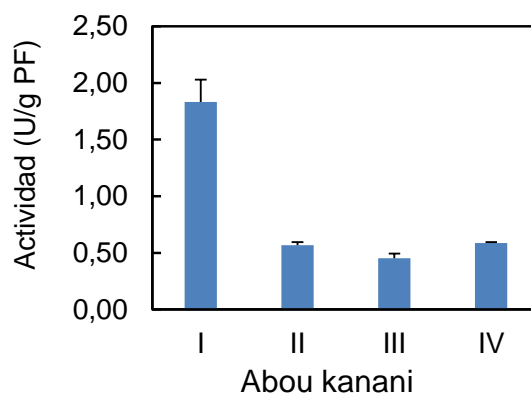
En cuanto a la actividad ADH también presentó menor variabilidad que la actividad LOX. De hecho, no se encontraron grandes oscilaciones a lo largo del proceso de maduración del fruto, ni se observaron tampoco grandes diferencias entre variedades.

Finalmente, el nivel de actividad enzimática AAT siguió un comportamiento similar a la ADH, con unos niveles de actividad aproximadamente constantes a lo largo de la maduración del fruto y sin grandes diferencias entre variedades.

**LOX**

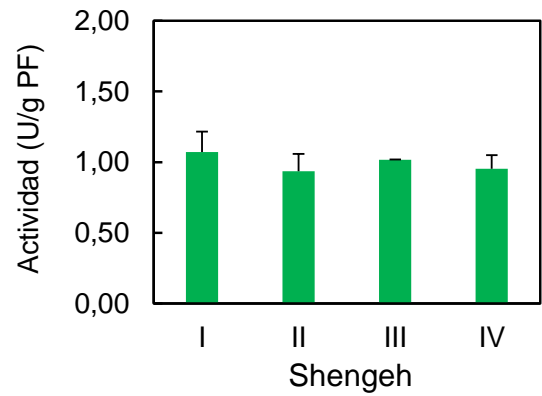
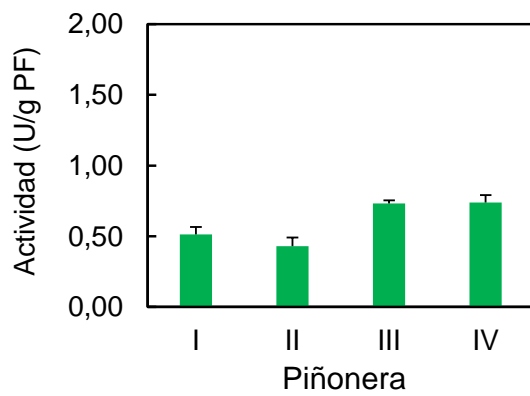
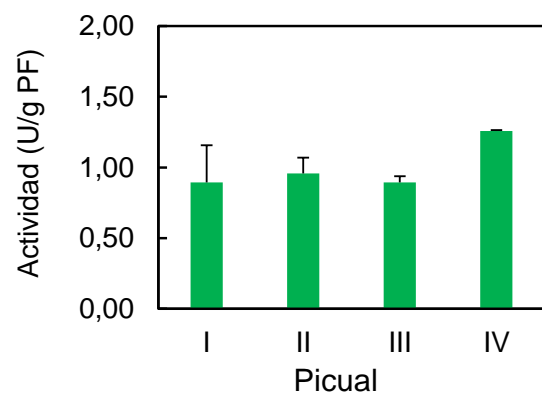
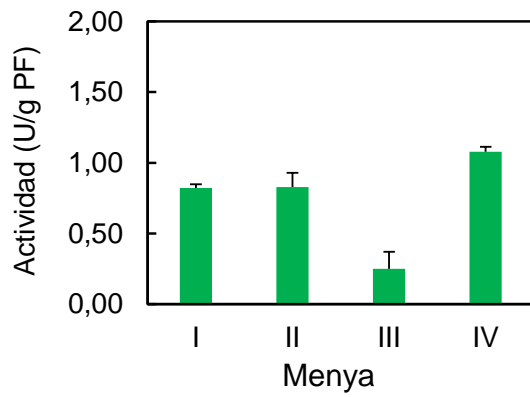
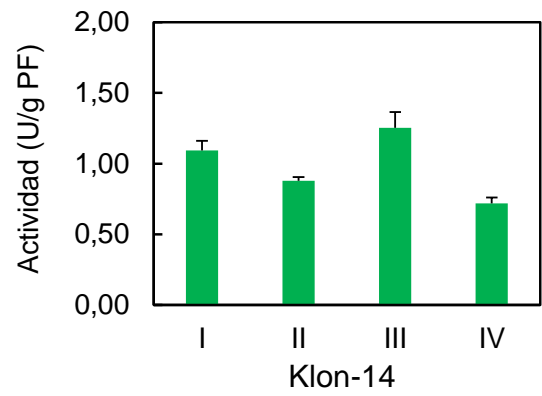
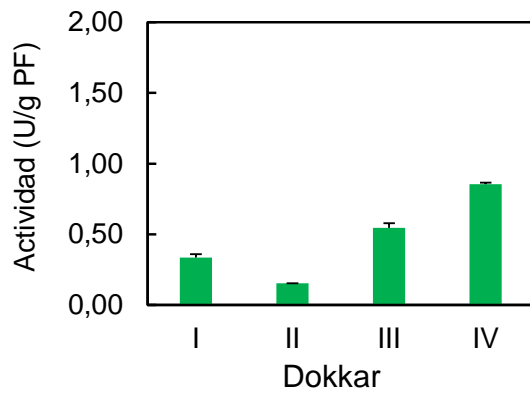
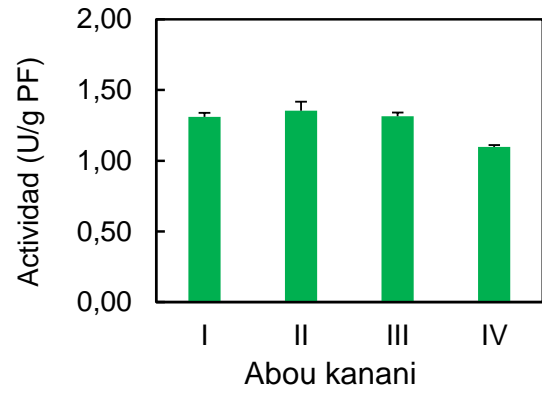


# HPL

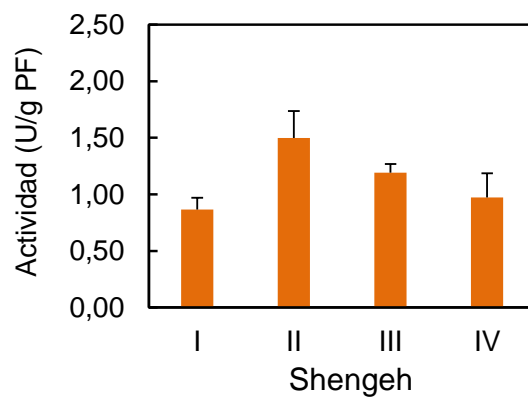
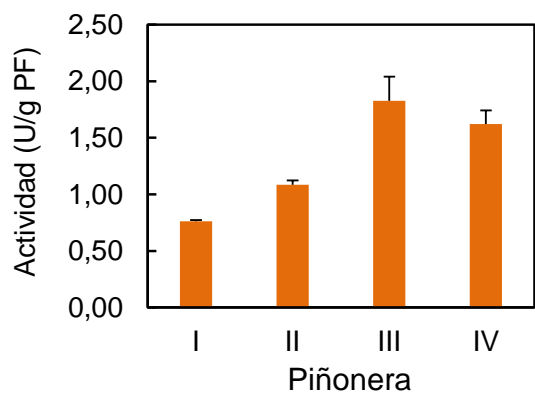
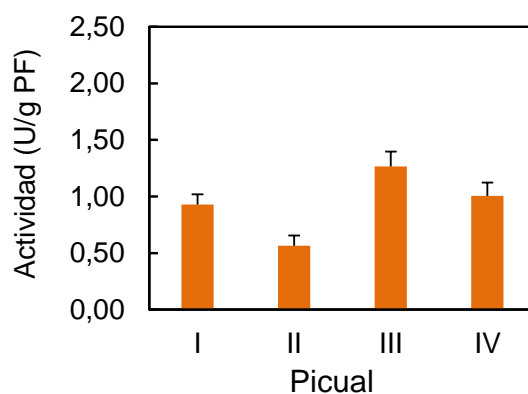
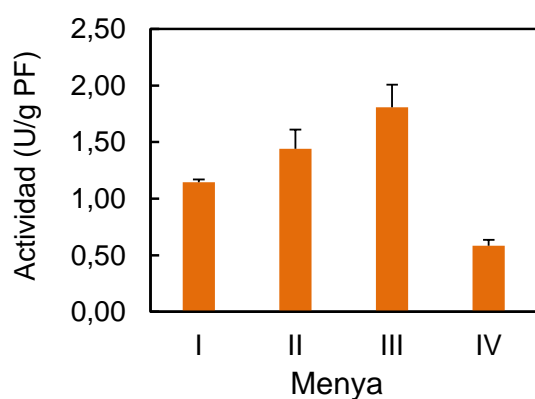
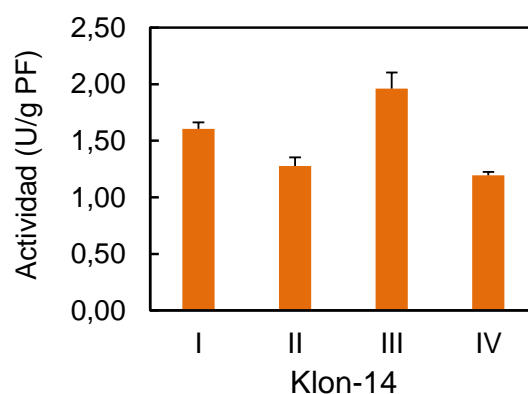
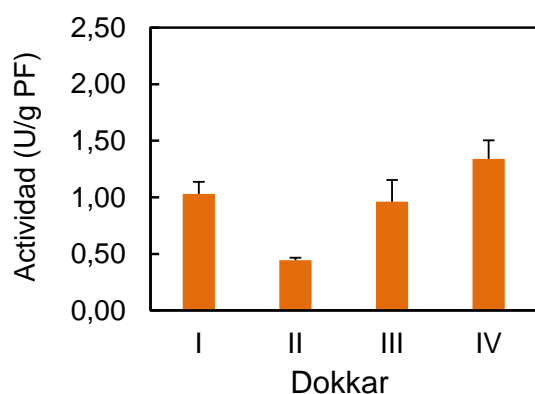
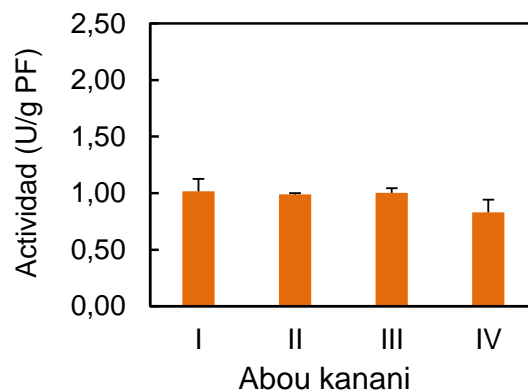




# ADH



**AAT**



**Figura 24. Evolución de los niveles de actividad de las cuatro enzimas principales de la ruta de la lipoxigenasa en mesocarpo de aceitunas de las variedades seleccionadas de la colección CN-36 durante el proceso de maduración del fruto.** Las actividades enzimáticas se midieron tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

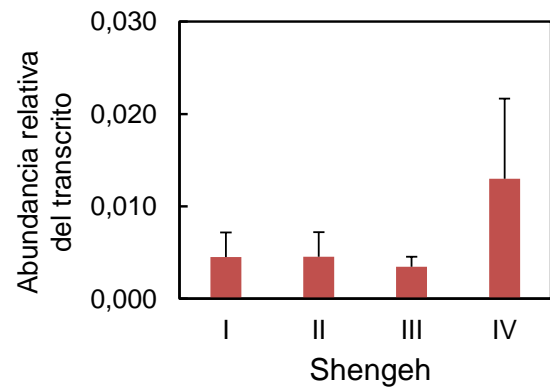
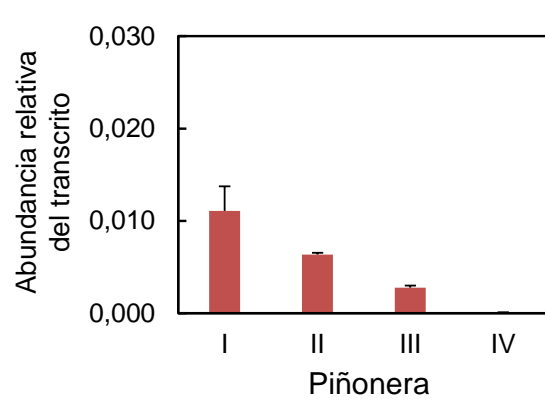
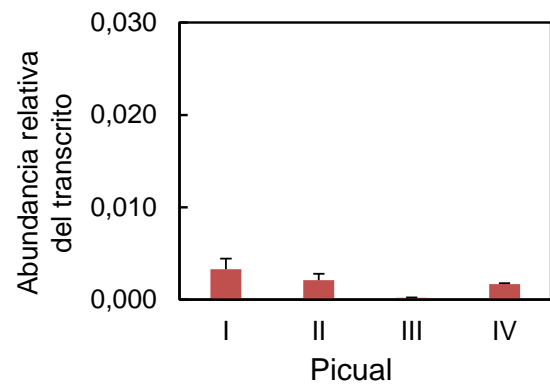
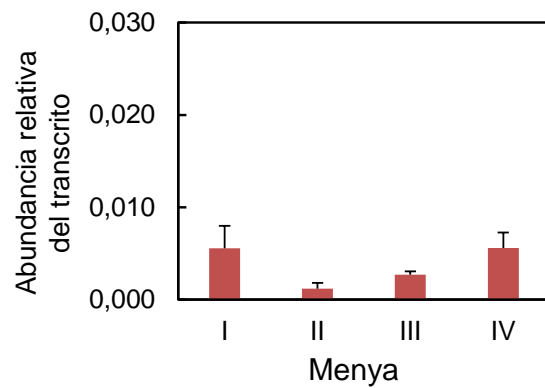
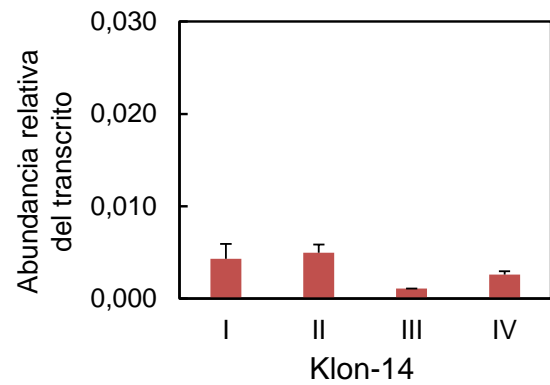
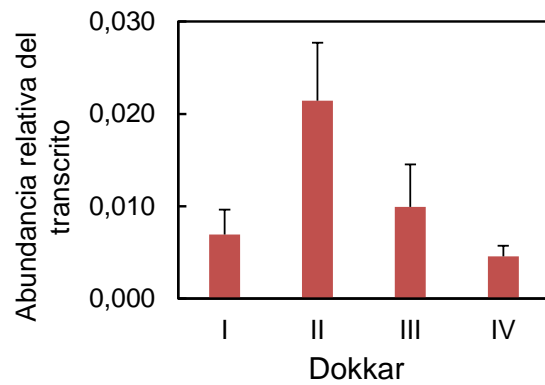
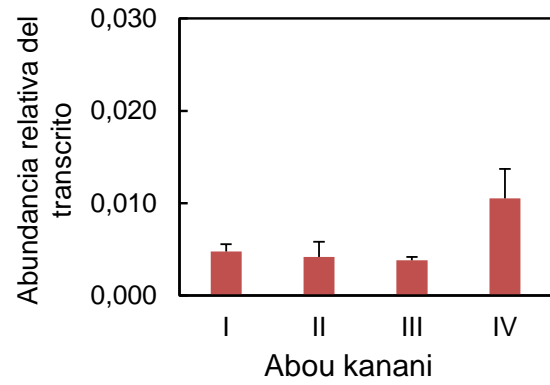
#### **IV.4.3. Niveles de expresión de los genes *LOX2* y *HPL* de las variedades seleccionadas de la colección CN-36**

Se llevó a cabo la determinación de los niveles de expresión de los genes *LOX* (tipo 2) y *HPL* mediante qRT-PCR, a lo largo del proceso de maduración del fruto, en las siete variedades de la CN-36 seleccionadas (Fig. 25).

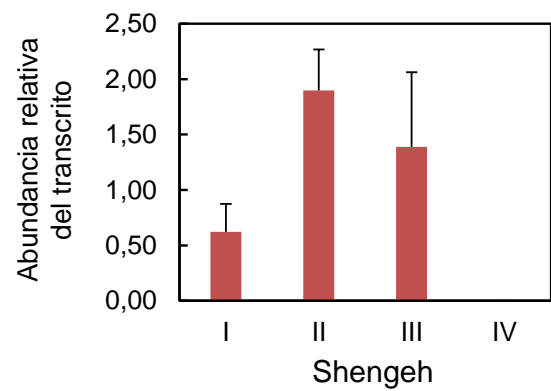
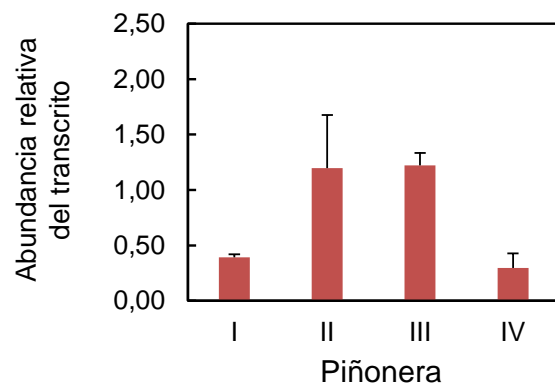
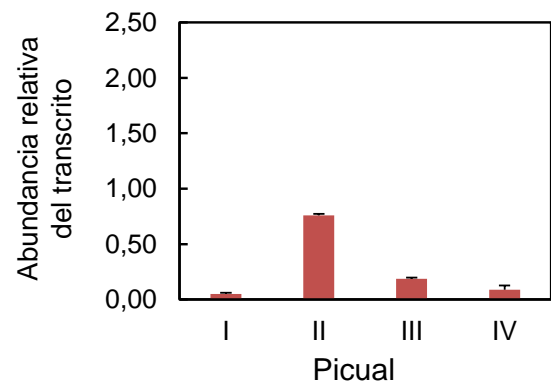
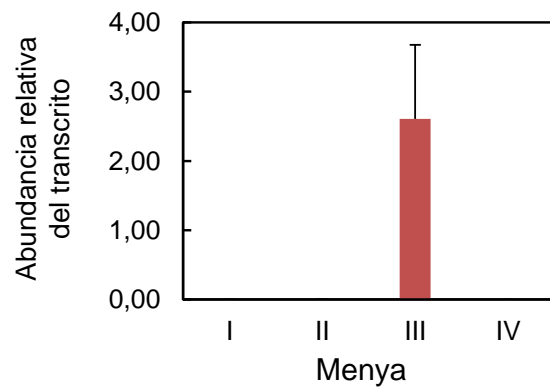
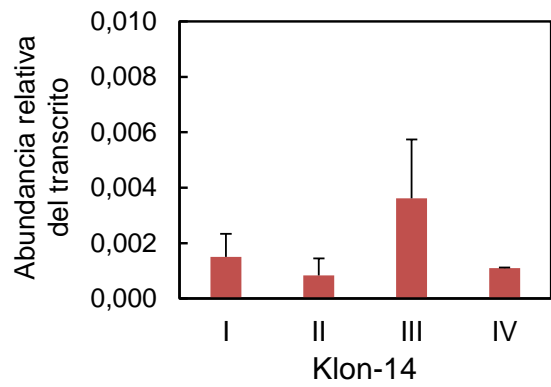
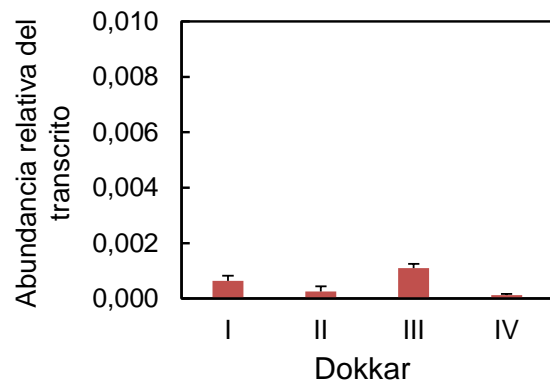
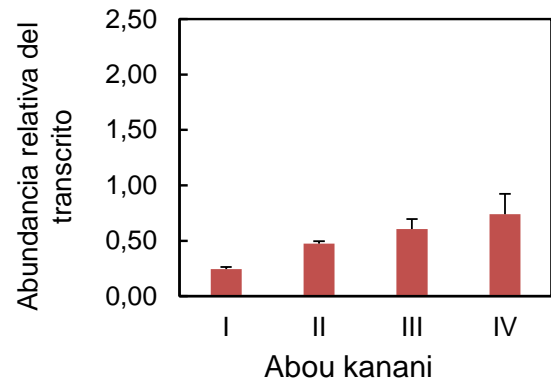
En relación a los tres genes *LOX2* estudiados, es especialmente destacable el alto nivel de expresión observado para el gen *Oe2LOX2* en las variedades Abou Kanani, Picual, Piñonera y Shengeh, no detectándose dicho gen en el resto de variedades. Además, en estas cuatro variedades se detecta un aumento de la expresión del gen *Oe2LOX2* a lo largo de la maduración del fruto (estadios I, II y III), que no se observa en el resto de genes *LOX* estudiados, donde presentan un patrón de evolución diferente en cuanto a su nivel de expresión en cada variedad. Por su parte, el gen *OeHPL* mostraba altos niveles de expresión en todas las variedades estudiadas.

Con respecto a las variedades seleccionadas por su mayor contenido en compuestos volátiles, Abou Kanani, Klon-14 y Piñonera, mostraron una alta expresión relativa de todos los genes estudiados comparando con las otras variedades, excepto Klon-14 para el gen *Oe2LOX2* que mostró unos niveles de expresión muy bajos. En cuanto a las variedades Shengeh y Menya, seleccionadas por su bajo contenido en compuestos volátiles, mostraron también altos niveles de expresión en todos los genes estudiados, excepto en el caso del gen *Oe2LOX2* de Menya, que presentaba valores bajos.

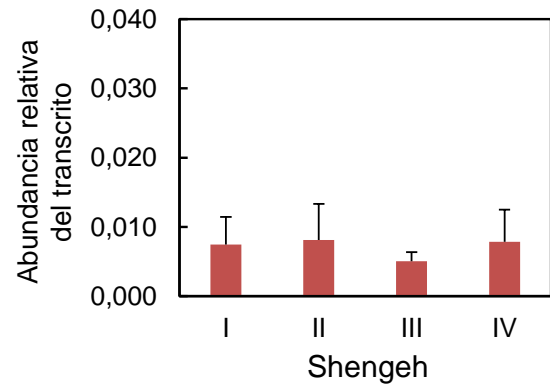
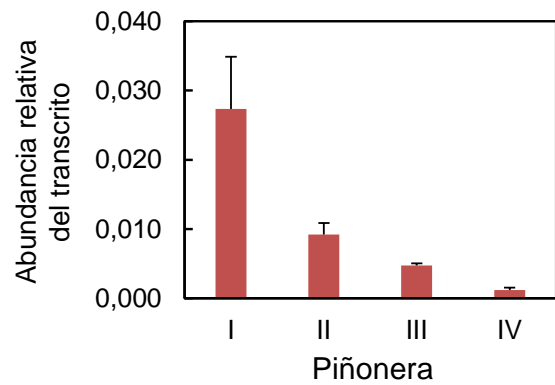
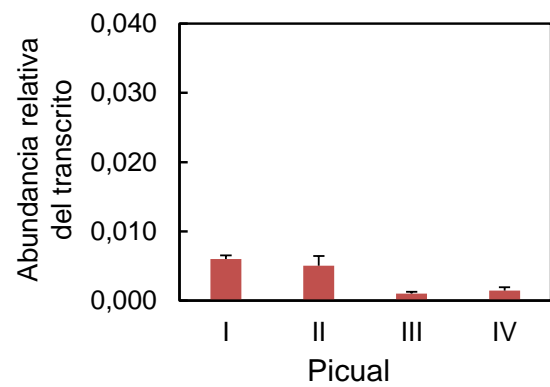
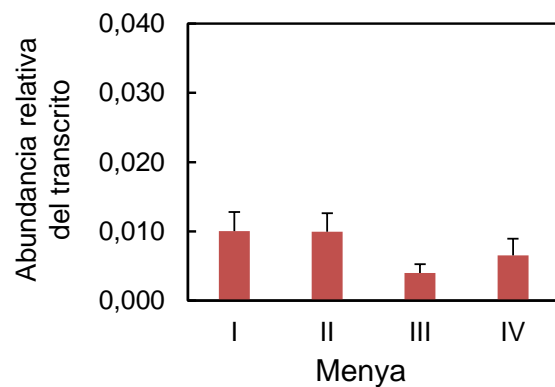
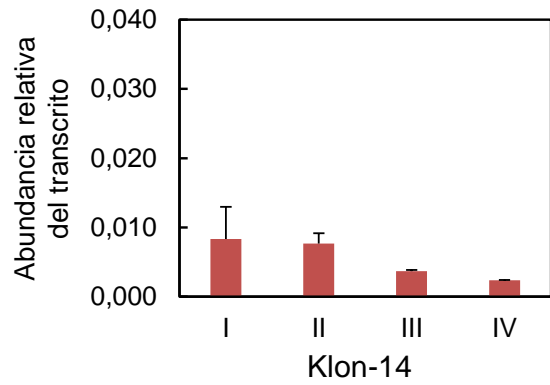
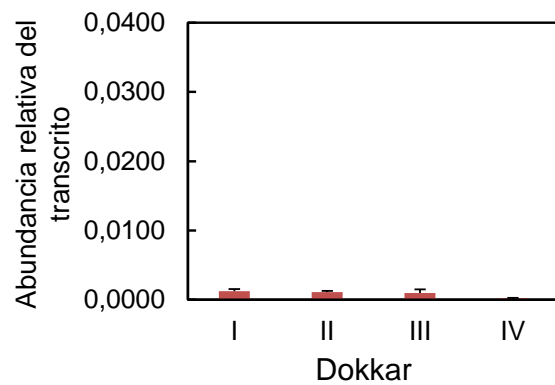
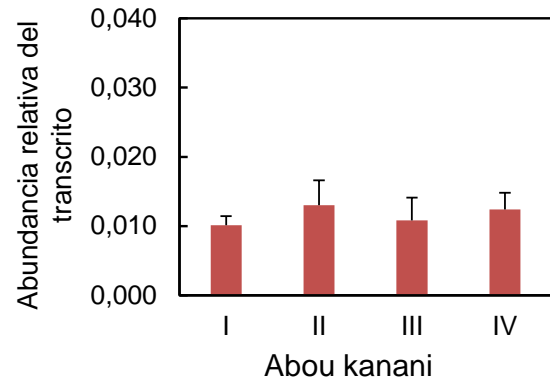
## ***Oe1LOX2***

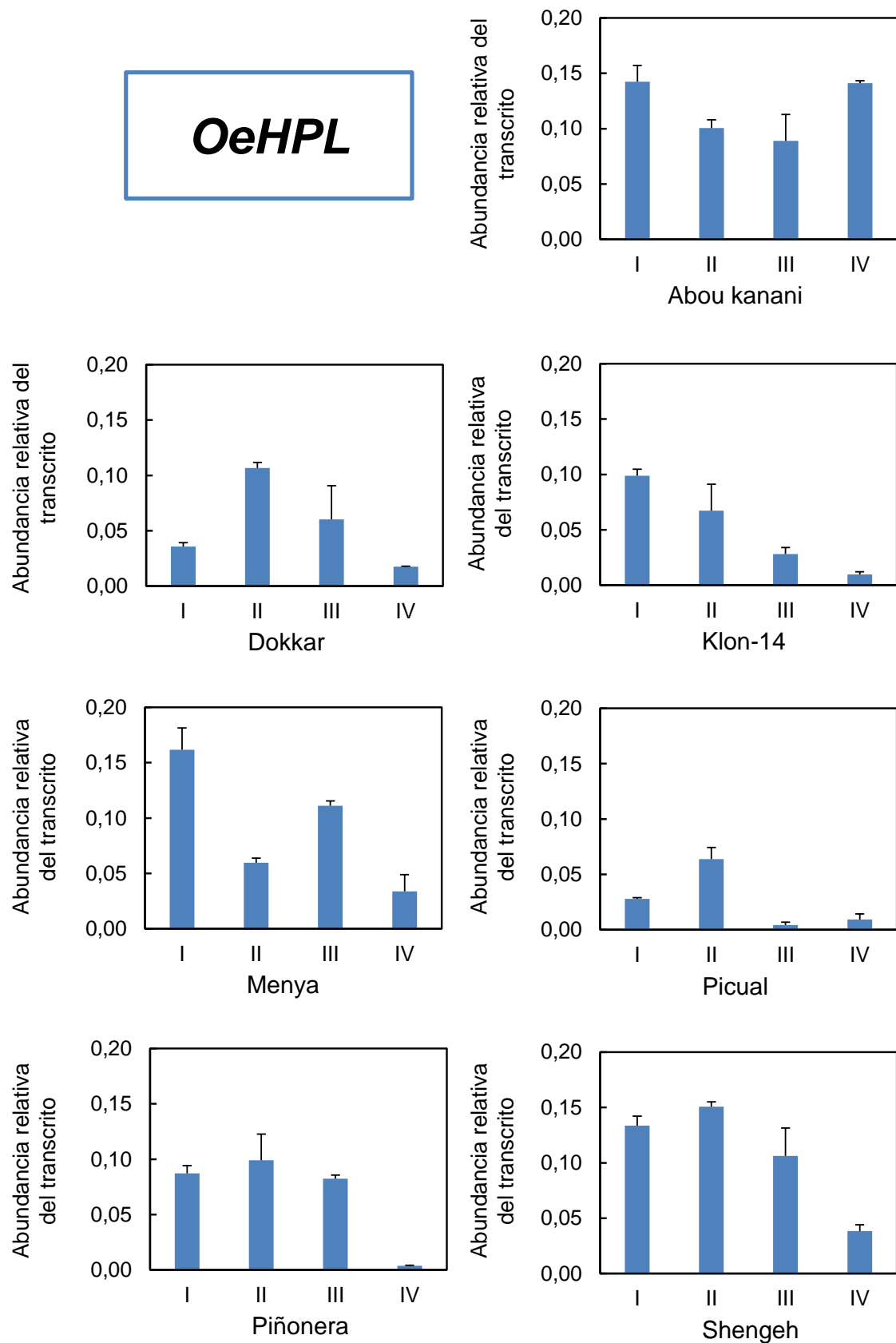


## ***Oe2LOX2***



## Oe3LOX2





**Figura 25.** Evolución de los niveles de abundancia relativa del transcrito de los genes *Oe1LOX2*, *Oe2LOX2*, *Oe3LOX2* y *OeHPL* en mesocarpio de aceitunas de las variedades seleccionadas de la CN-36 durante el proceso de maduración del fruto. Los niveles de abundancia relativa del transcrito

se determinaron mediante qRT-PCR, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

#### **IV.4.4. Correlaciones entre metabolitos, actividad enzimática y expresión génica en las variedades seleccionadas de la colección CN-36**

Se llevó a cabo un estudio de correlaciones para detectar posibles relaciones entre expresión génica, actividad enzimática y metabolitos en los AOVs obtenidos a partir de las variedades de la CN-36 (Tab. 10 A).

Entre los resultados más destacados, se observó una correlación significativa entre el contenido de compuestos C6/LA y la actividad LOX ( $r = 0,50$ ,  $p < 0,05$ ). Por otra parte, se encontró una correlación negativa entre el contenido en compuestos C5/LnA ( $r = -0,42$ ) y C5/LA ( $r = -0,56$ ,  $p < 0,01$ ) y el nivel de expresión del gen *Oe2LOX2*.

No se encontró ninguna correlación significativa de la actividad HPL con el nivel de ninguna clase de compuestos volátiles, incluso se han encontrado valores de  $r$  negativos con el contenido de C6/LA (Tab. 10 A). Se han observado valores negativos significativos ( $p < 0,05$ ) para el contenido en alcoholes C6 tanto de LnA como de LA ( $r = -0,51$ ;  $-0,45$ ).

El nivel de actividad ADH presentó un nivel de correlación relativamente alto y, por lo general, significativo ( $p < 0,05$ ) con sus productos de reacción en la ruta LOX, como con los alcoholes C6/LnA ( $r = 0,49$ ), carbonilos C5/LnA ( $r = 0,52$ ), y carbonilos C5/LA ( $r = 0,55$ ) (Tab. 10 B).

Con respecto a la actividad AAT, no se encontraron correlaciones significativas con el contenido en ésteres de la fracción volátil del AOV. Cabe destacar la correlación negativa con el contenido de los sustratos de la reacción, alcoholes C6 derivados de LnA y LA ( $r = -0,38$ ;  $-0,37$ ).

En cuanto a la relación entre actividad enzimática y expresión génica, se observó, en general, un bajo nivel de correlación, no significativa ( $p < 0,05$ ), entre la actividad enzimática LOX y HPL y el nivel de expresión de los correspondientes genes.

Se encontró que la actividad LOX correlaciona aparentemente, en mayor medida, con la expresión del gen *Oe3LOX2* ( $r = 0,38$ ), sin embargo, la correlación con



la expresión del gen *Oe2LOX2* fue baja ( $r = 0,11$ ) y nula con el nivel de expresión del gen *Oe1LOX2*.

No se observó correlación entre la actividad HPL y el nivel de expresión del único gen HPL, *OeHPL*, que existe en aceituna (Tab. 10 C). Sin embargo, es de destacar el relativamente alto y significativo grado de correlación entre la expresión del gen *OeHPL* con los genes *Oe2LOX2* ( $r = 0,73$ ) y *Oe3LOX2* ( $r = 0,59$ ).

**Tabla 10. Coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) entre variables metabólicas, bioquímicas y moleculares de las variedades seleccionadas de la colección nuclear CN-36.**

<b>A</b>					
	C6/LnA	C6/LA	C5/LnA	C5/LA	
Actividad LOX	0,02	0,50 *	-0,20	-0,09	
<i>Oe1LOX2</i>	0,03	0,41	-0,19	0,14	
<i>Oe2LOX2</i>	-0,26	0,22	-0,42	-0,56 **	
<i>Oe3LOX2</i>	-0,06	0,48 *	-0,20	0,08	
Actividad HPL	0,06	-0,40	0,01	-0,25	
<i>OeHPL</i>	-0,19	0,41	-0,44	-0,29	
<b>B</b>					
	Alcoholes C6/LnA	Alcoholes C6/LA	Carbonilos C5/LnA	Carbonilos C5/LA	
Actividad ADH	0,51 *	0,39	0,48 *	0,55 *	
<b>C</b>					
	Actividad LOX	<i>Oe1LOX2</i>	<i>Oe2LOX2</i>	<i>Oe3LOX2</i>	Actividad HPL
<i>Oe1LOX2</i>	-0,01				
<i>Oe2LOX2</i>	0,11	-0,01			
<i>Oe3LOX2</i>	0,38	0,40	0,16		
Actividad HPL	-0,21	-0,32	0,13	0,00	
<i>OeHPL</i>	0,18	0,34	0,73 ***	0,59 **	-0,09

\* indica diferencia significativa para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  y \*\*\* para  $p < 0,001$ .

#### **IV.5. ESTUDIO METABÓLICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES DEL ACEITE EN LINEAS DE OLIVO SELECCIONADAS CON EL MISMO FONDO GENÉTICO (CRUZAMIENTOS PICUAL X ARBEQUINA)**

A partir de un estudio previo realizado en el grupo de investigación (Pérez et al., 2016), se seleccionaron cinco líneas del cruzamiento Picual x Arbequina (Tab. 11), en función del contenido total de compuestos en la fracción volátil de los aceites y la presencia de niveles altos de ésteres entre ellos, para su estudio detallado a lo largo del proceso de maduración del fruto a nivel metabólico, bioquímico y génico.

Como en el caso de las variedades seleccionadas de la colección CN-36, los cruzamientos seleccionados se recolectaron directamente de los árboles en cuatro estadios de maduración (I, II, III y IV).

**Tabla 11. Variedades con similar fondo genético seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina para seguimiento durante el proceso de maduración del fruto.**

Línea	Características
5-12	Alto contenido en compuestos volátiles
56-12	Contenido medio en compuestos volátiles
56-61	Contenido medio en compuestos volátiles (alto en ésteres LOX)
4-23	Contenido medio-bajo en compuestos volátiles
54-44	Bajo contenido en compuestos volátiles

##### **IV.5.1. Análisis de compuestos volátiles en homogeneizados obtenidos de mesocarpio de aceituna**

La baja producción de frutos de los individuos de la progenie del cruzamiento Picual x Arbequina impidió realizar un estudio de la fracción volátil de los aceites. Para soslayar esta circunstancia, se estudió la posibilidad de realizar los análisis en homogeneizados de mesocarpio como se describe en Materiales y Métodos. Para ello, se realizó un estudio de la validez del método utilizando aceitunas de las variedades Picual y Arbequina y obteniendo en paralelo los correspondientes aceites y homogeneizados de mesocarpio. De esta forma, se llevó a cabo el análisis de compuestos volátiles tanto en

los aceites como en los homogeneizados obtenidos y se estudió el nivel de correlación entre las distintas clases de compuestos volátiles.

**Tabla 12. Correlaciones obtenidas tras el análisis y comparación de los compuestos volátiles obtenidos en aceites y en homogeneizados de mesocarpio de aceituna.** Los compuestos volátiles se obtuvieron y analizaron tal y como se describe en Materiales y Métodos, el estudio estadístico se realizó empleando el coeficiente de correlación de Pearson.

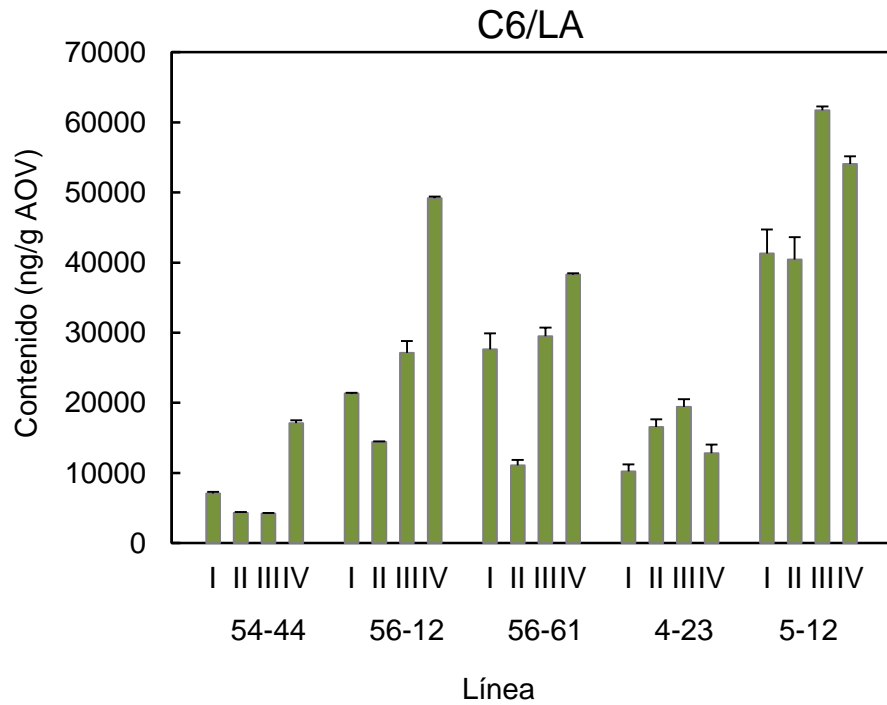
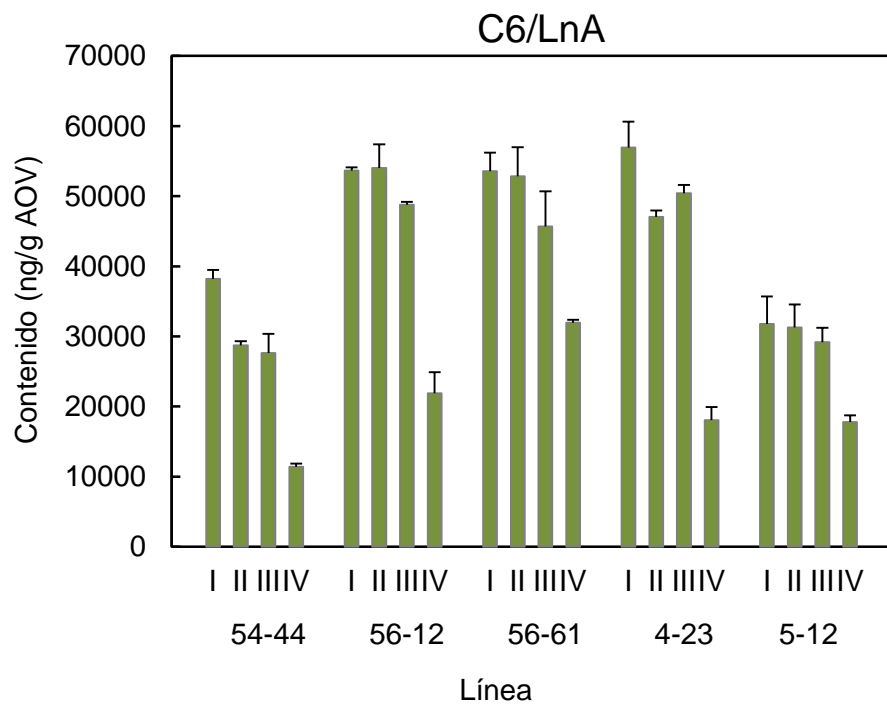
Grupo de compuestos volátiles	Correlación ( <i>r</i> de Pearson)
$\Sigma$ C6/LnA	0,87p < 0,01
$\Sigma$ C5/LnA	0,85p < 0,01
$\Sigma$ ésteres LOX	0,73p < 0,05
$\Sigma$ volátiles AA	0,92p < 0,001

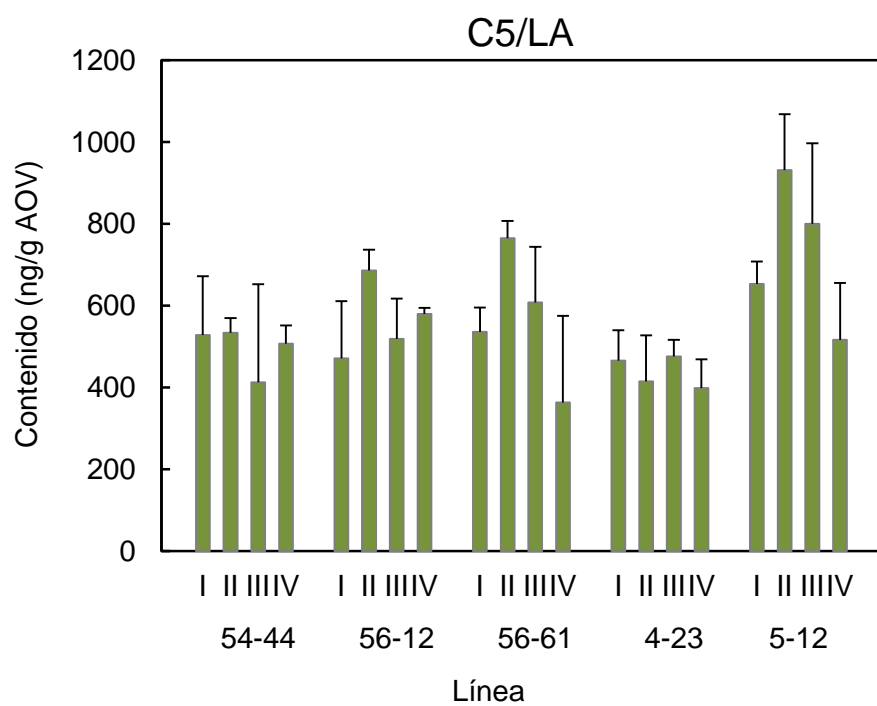
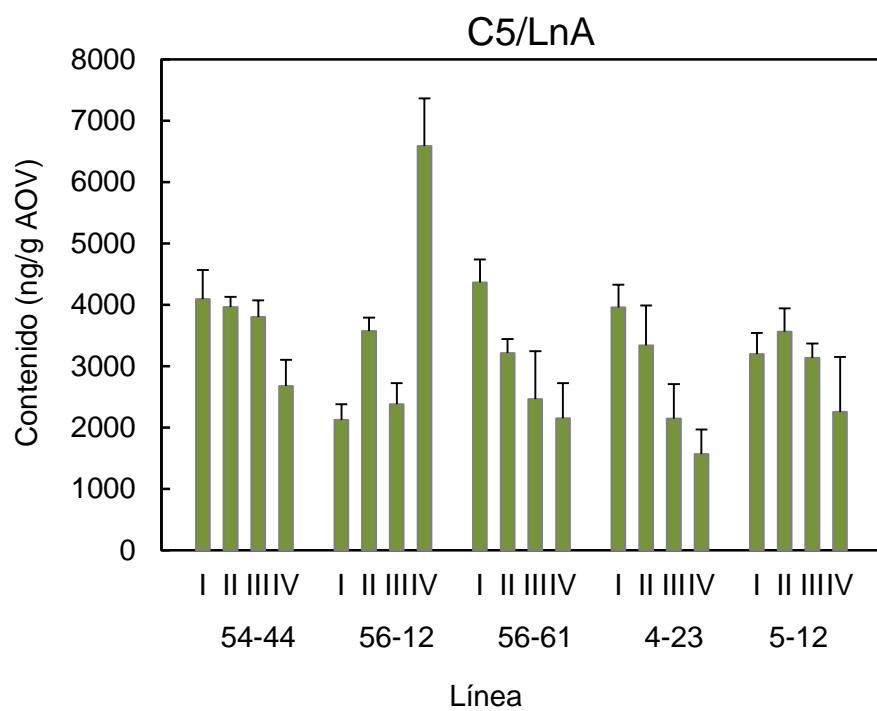
Tal como se muestra en la Tabla 12, los compuestos volátiles mayoritarios en homogeneizados de aceituna presentaban un alto coeficiente de correlación con aquellos obtenidos en aceite. Estos resultados confirman la validez del método de análisis de compuestos volátiles en homogeneizados de mesocarpio de aceituna en lugar del estudio de la fracción volátil en los correspondientes aceites.

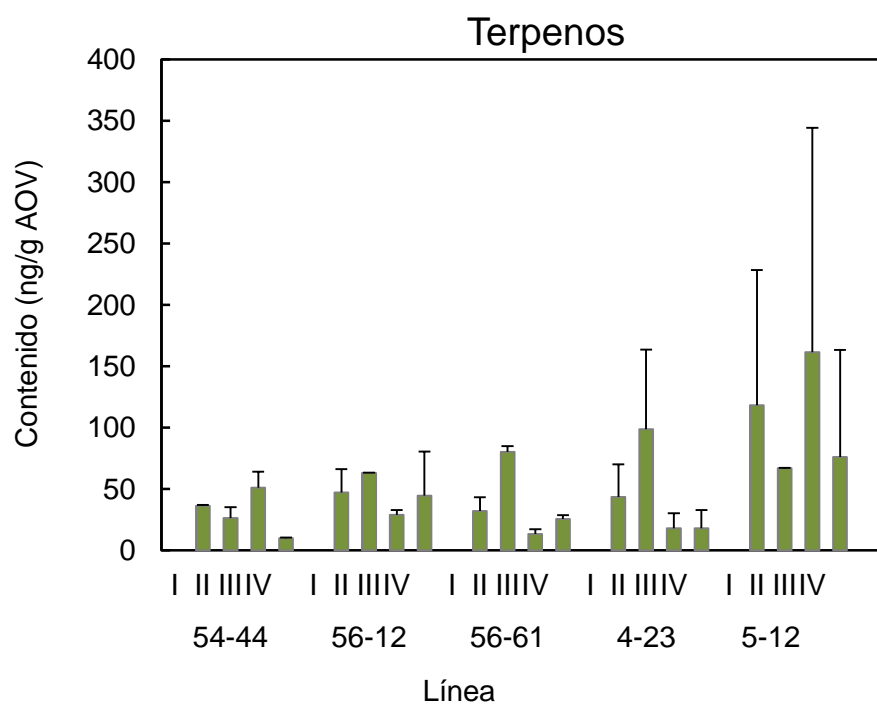
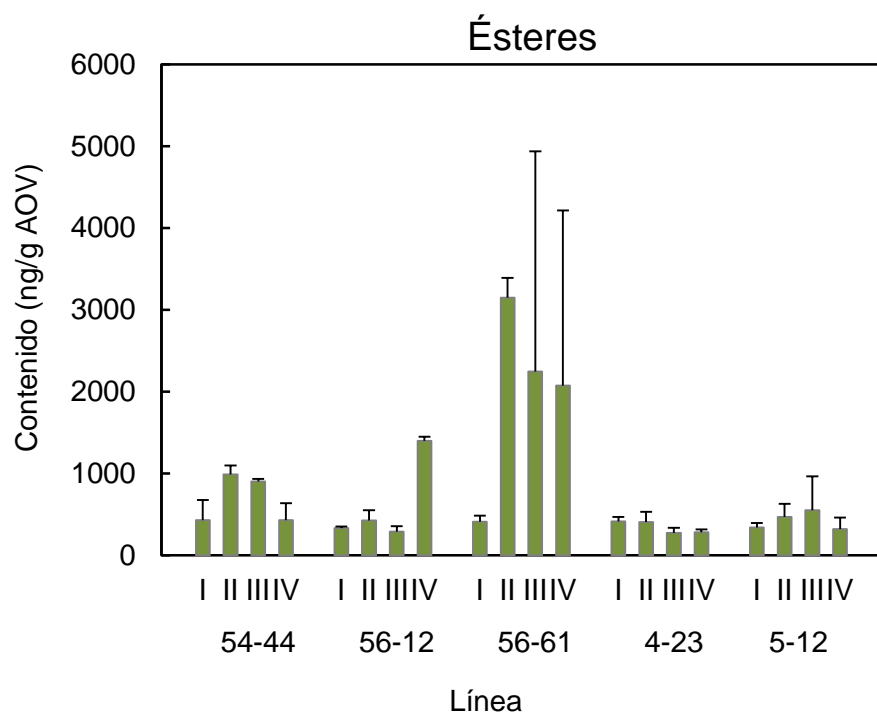
#### **IV.5.2. Análisis de los compuestos volátiles del aceite de líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina**

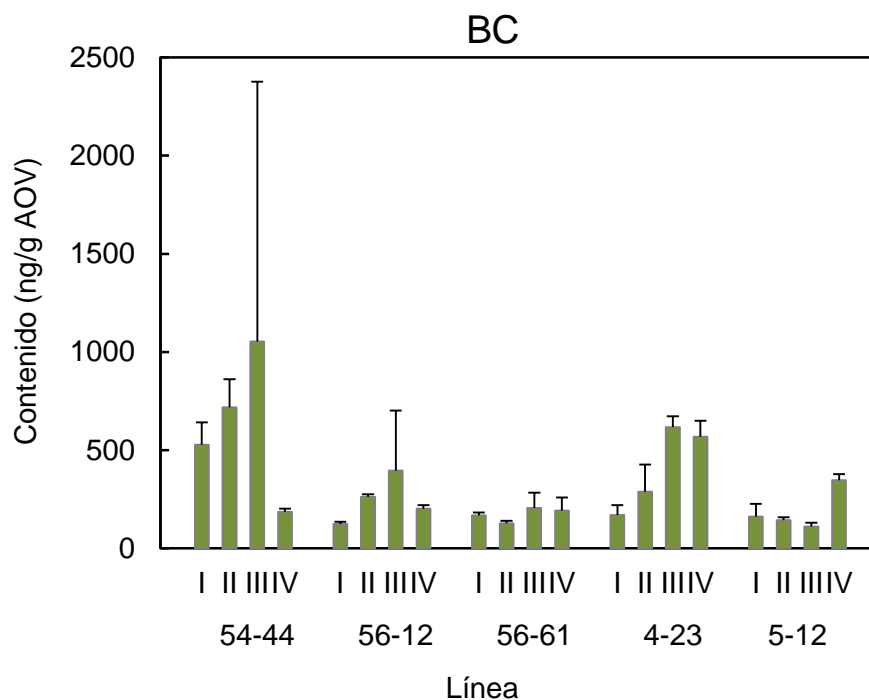
Como se ha comentado en el apartado anterior, a diferencia del estudio realizado con las variedades de la CN-36, el estudio se realizó con homogeneizados de mesocarpio de aceituna.

Los resultados obtenidos en las cinco líneas del cruzamientos Picual x Arbequina (Fig. 26) mostraron un patrón de evolución del contenido total en compuestos volátiles característicos de cada línea, aunque en general se observa un incremento del contenido de compuestos volátiles en los estadios II y III, y un descenso en el IV, a excepción de la línea 56/12. El cruzamiento 54/44 fue el que menor contenido en compuestos volátiles presentó.









**Figura 26.** Evolución del contenido de compuestos volátiles en homogeneizados de las líneas del cruzamiento Picual x Arbequina seleccionadas durante el proceso de maduración del fruto. Los volátiles se analizaron según se indica en Materiales y Métodos.

#### **IV.5.3. Niveles de actividad de las enzimas de la ruta LOX de líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina**

Con el objetivo de caracterizar bioquímicamente las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina en relación a la biosíntesis de compuestos volátiles, se llevó a cabo un seguimiento del nivel de actividad enzimática de las cuatro enzimas principales de la ruta de la lipoxigenasa, LOX, HPL, ADH y AAT durante el proceso de maduración del fruto.

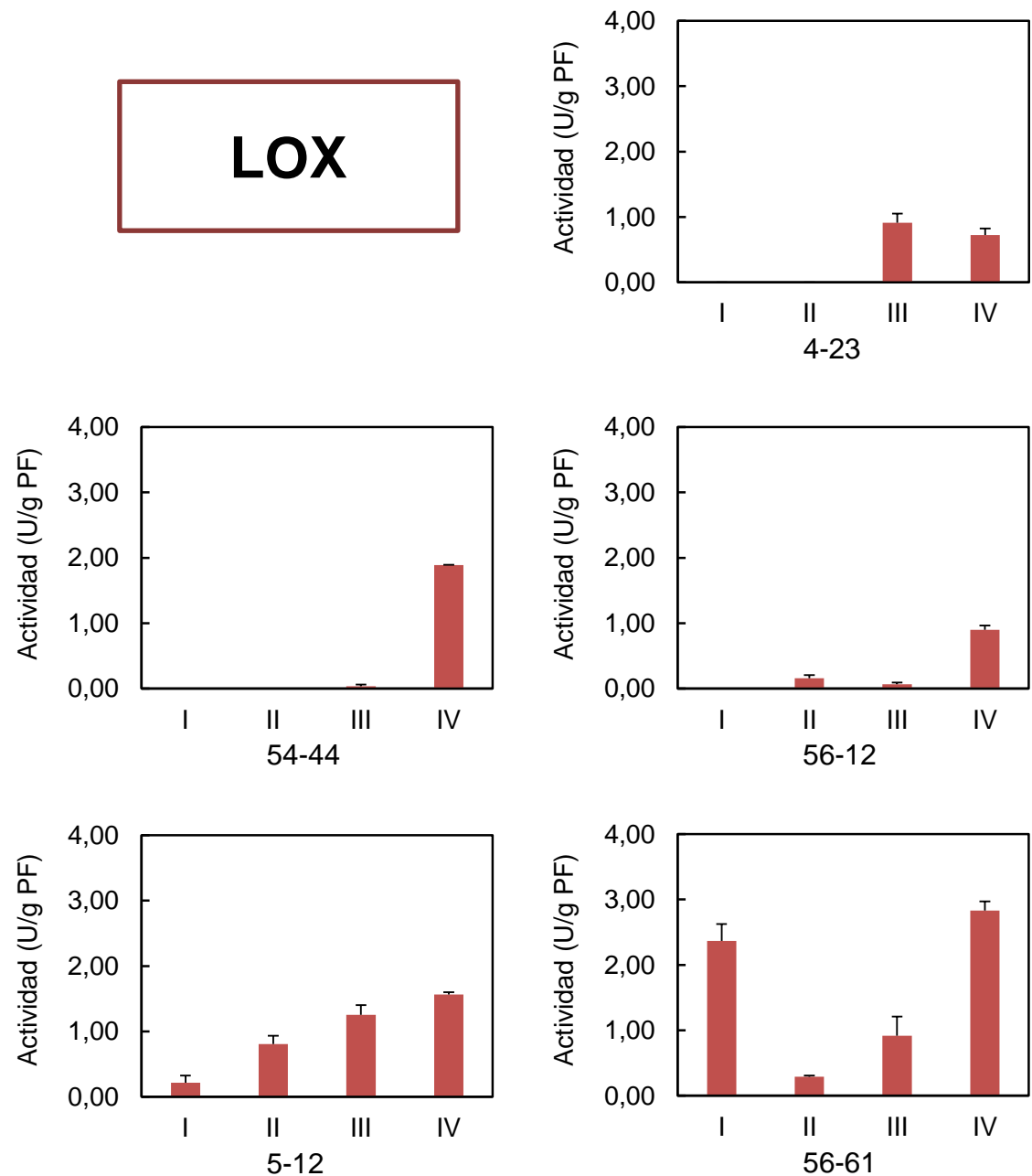
Los resultados (Fig. 27) mostraron que la actividad LOX aumentaba con la maduración del fruto, y que los mayores niveles de actividad los presentaba la línea 56/61.

La actividad enzimática HPL mostró un perfil con ligeras oscilaciones en general, no mostrando grandes diferencias entre las líneas seleccionadas estudiadas, con

excepción de la línea 5/12, donde se observó un importante aumento de actividad al pasar del estadio II al III que se mantiene hasta el final de la maduración del fruto.

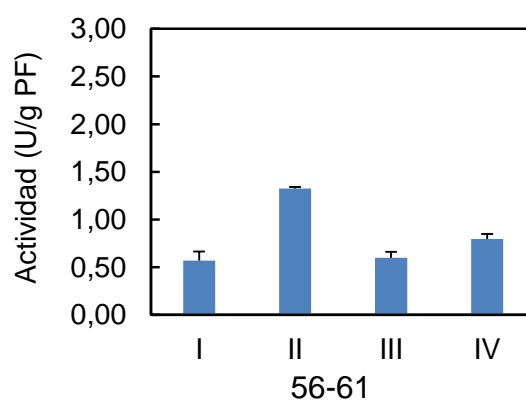
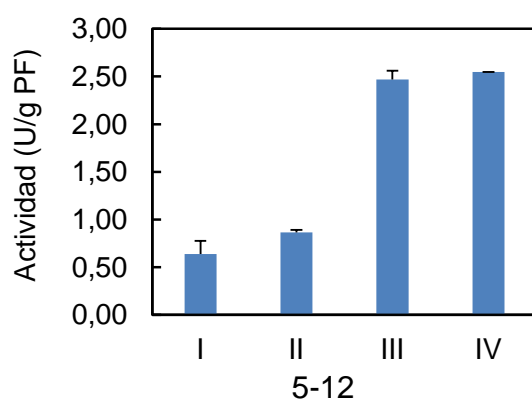
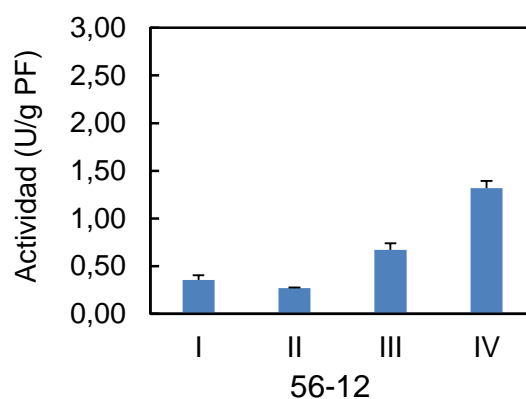
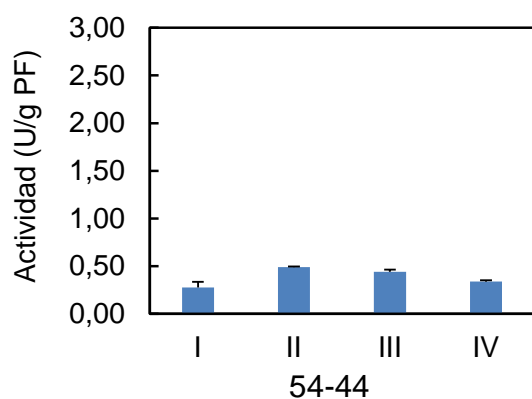
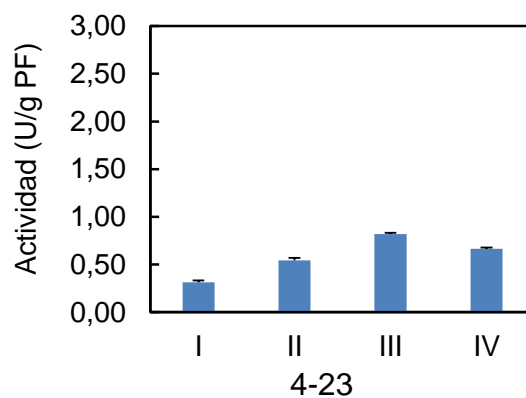
La actividad ADH presentó, en términos generales, una tendencia a aumentar a lo largo de la maduración del fruto, siendo este efecto más acusado en la línea del cruzamiento 56/12.

Los resultados mostraron también que la actividad enzimática AAT se mantuvo prácticamente constante durante el proceso de maduración del fruto, no observándose grandes diferencias entre las distintas líneas del cruzamiento analizadas.

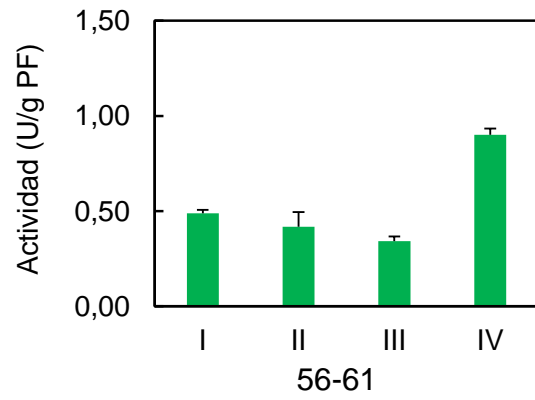
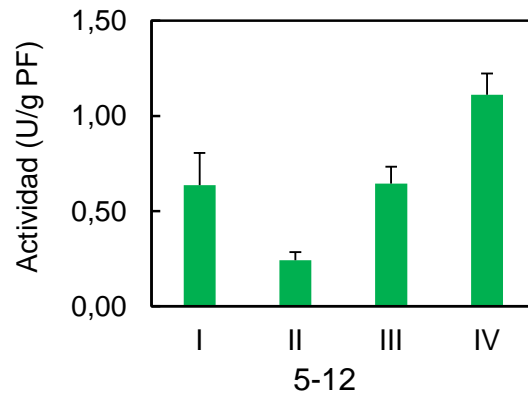
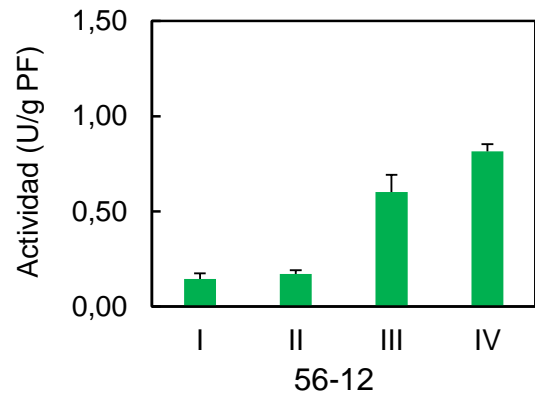
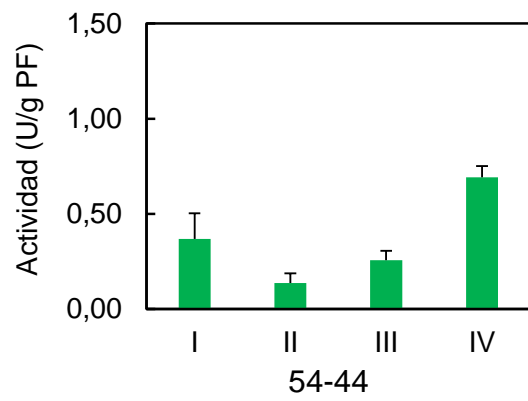
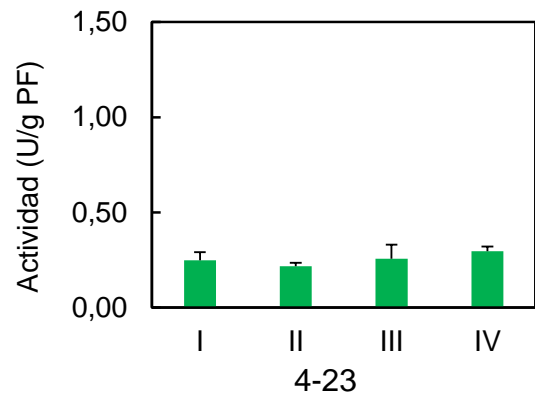


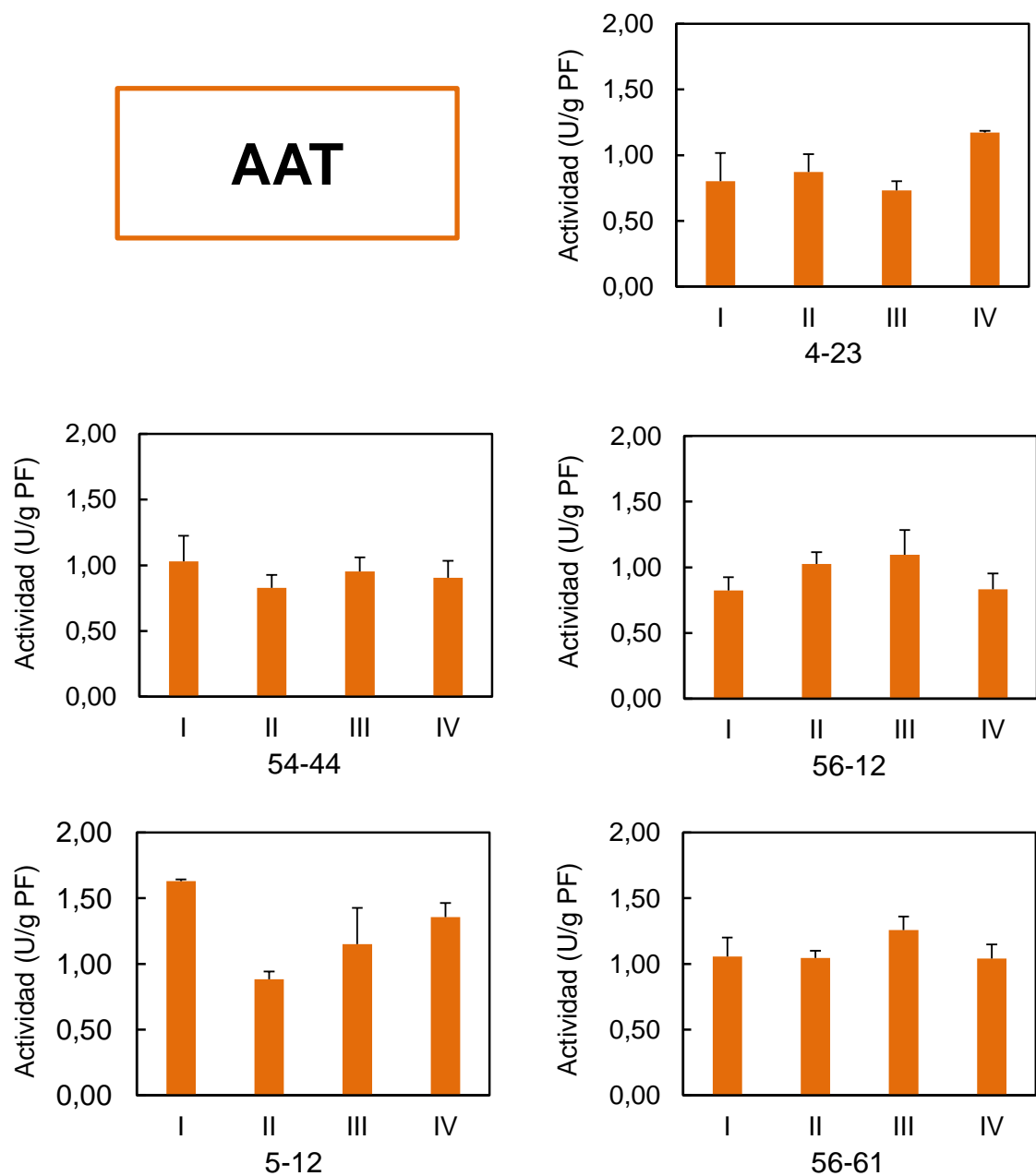


# HPL



# ADH





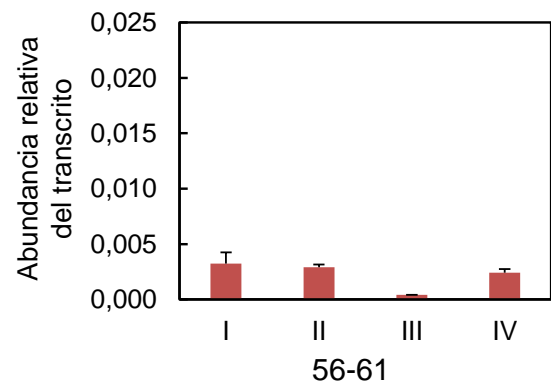
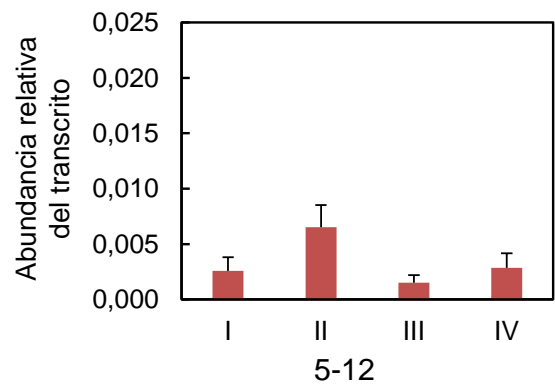
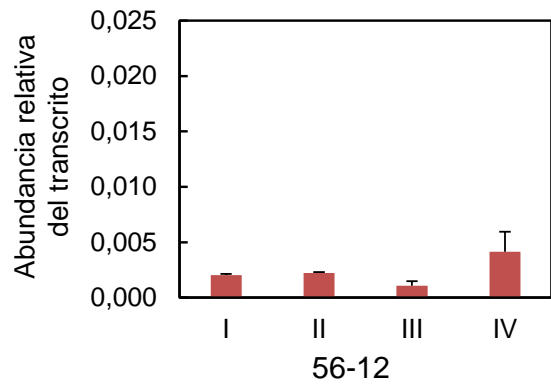
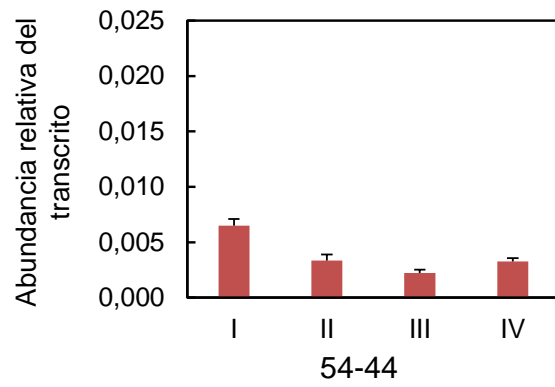
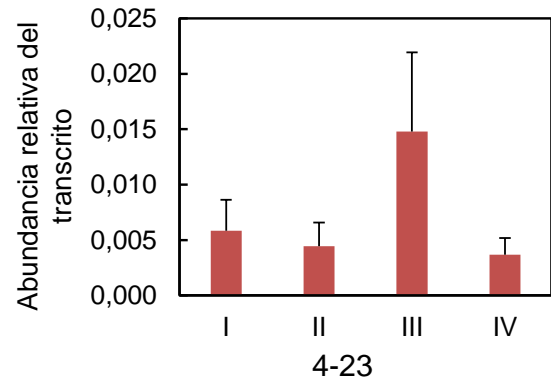
**Figura 27. Evolución de los niveles de actividad de las cuatro enzimas principales de la ruta de la lipoxigenasa en mesocarpio de aceitunas de las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina durante el proceso de maduración del fruto.** Las actividades enzimáticas se midieron tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

#### **IV.5.4. Niveles de expresión de los genes *LOX2* y *HPL* de las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina**

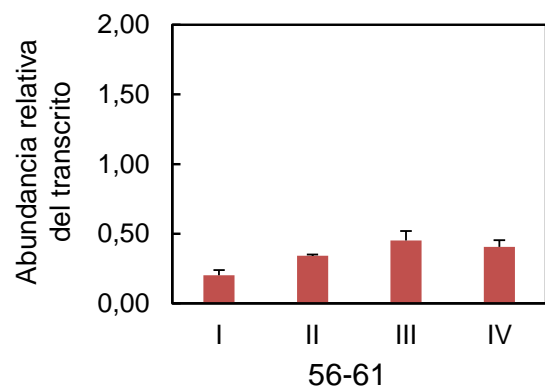
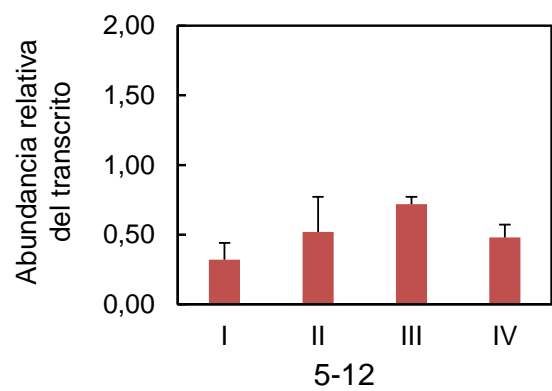
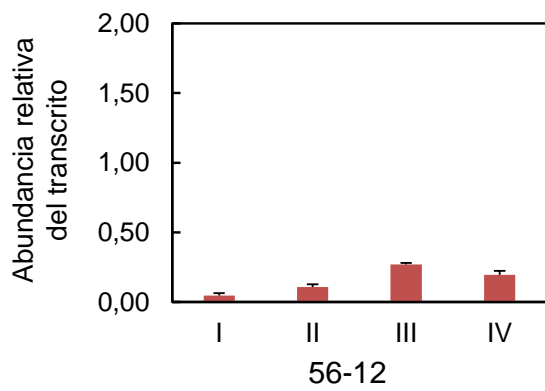
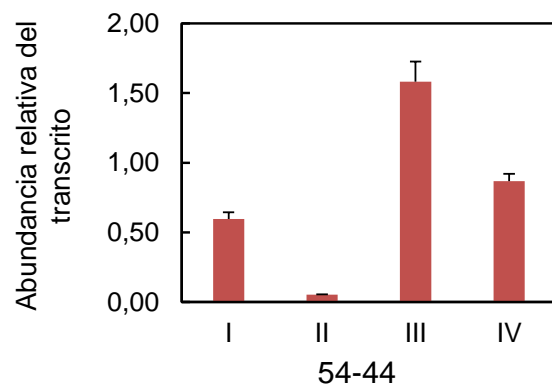
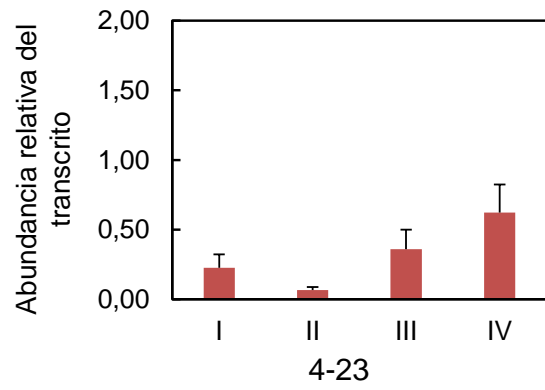
Para determinar si el contenido de compuestos volátiles que caracteriza a cada una de las líneas de olivo seleccionadas está relacionado por la expresión de los genes lipoxigenasa e hidroperóxido liasa de olivo, se estudió el nivel de expresión de los genes *Oe1LOX2*, *Oe2LOX2*, *Oe3LOX2* y *OeHPL* en mesocarpo del fruto durante su proceso de maduración (Fig. 28).

Los resultados obtenidos mostraron un alto nivel de expresión del gen *Oe2LOX2*, y que los niveles de transcrito de dicho gen eran mayores en los estadios de maduración más avanzados (III y IV). Por su parte, el gen *Oe1LOX2* mostró un nivel de expresión prácticamente constante a lo largo del proceso de maduración, a excepción del máximo de expresión que se encontró en el envero en el cruzamiento 4-23. También se observó que el gen *Oe3LOX2* presentaba un perfil de expresión muy similar al del gen *Oe1LOX2*, y que al contrario al del gen *Oe2LOX2*, disminuía ligeramente su expresión a lo largo de la maduración, con niveles muy similares en los cinco cruzamientos estudiados. En el caso del gen *OeHPL*, se detectaron mayores niveles de expresión en las fases más avanzadas de la maduración, excepto para el cruzamiento 5-12, en el que el máximo nivel de expresión de dicho gen se producía en los estadios II y III.

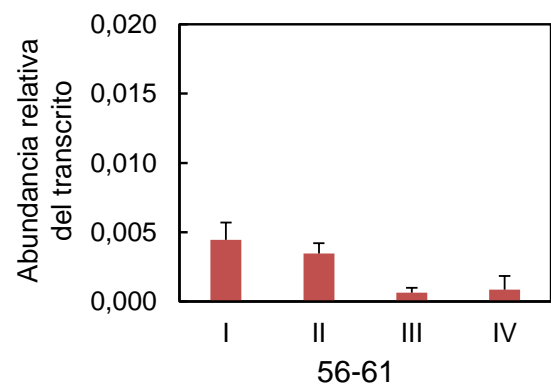
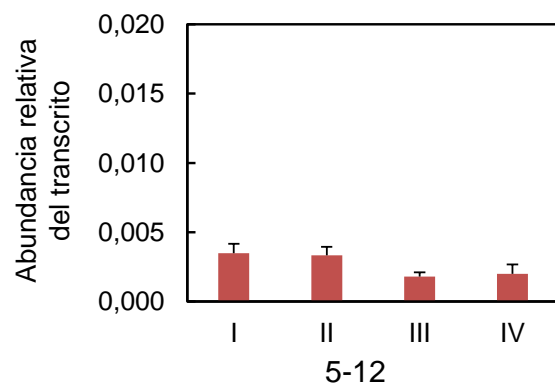
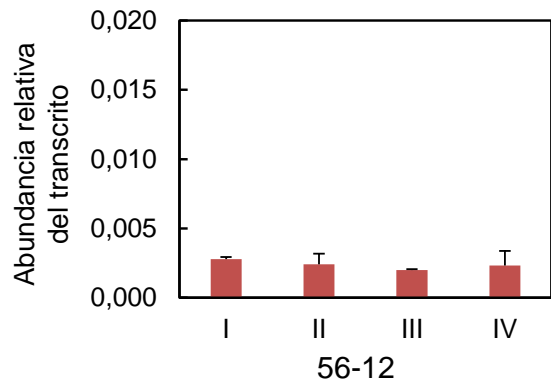
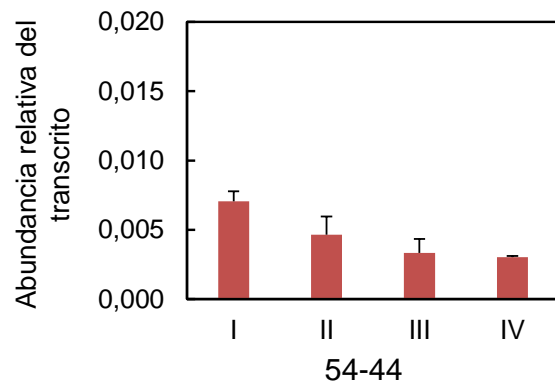
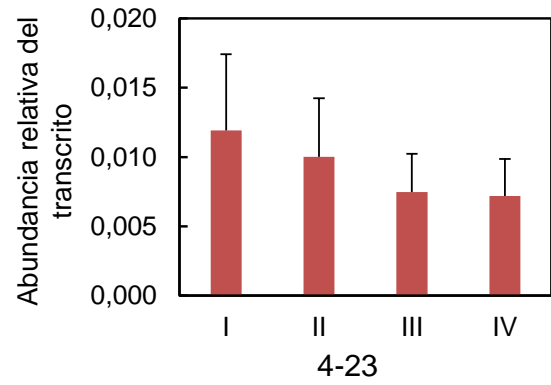
## ***Oe1LOX2***

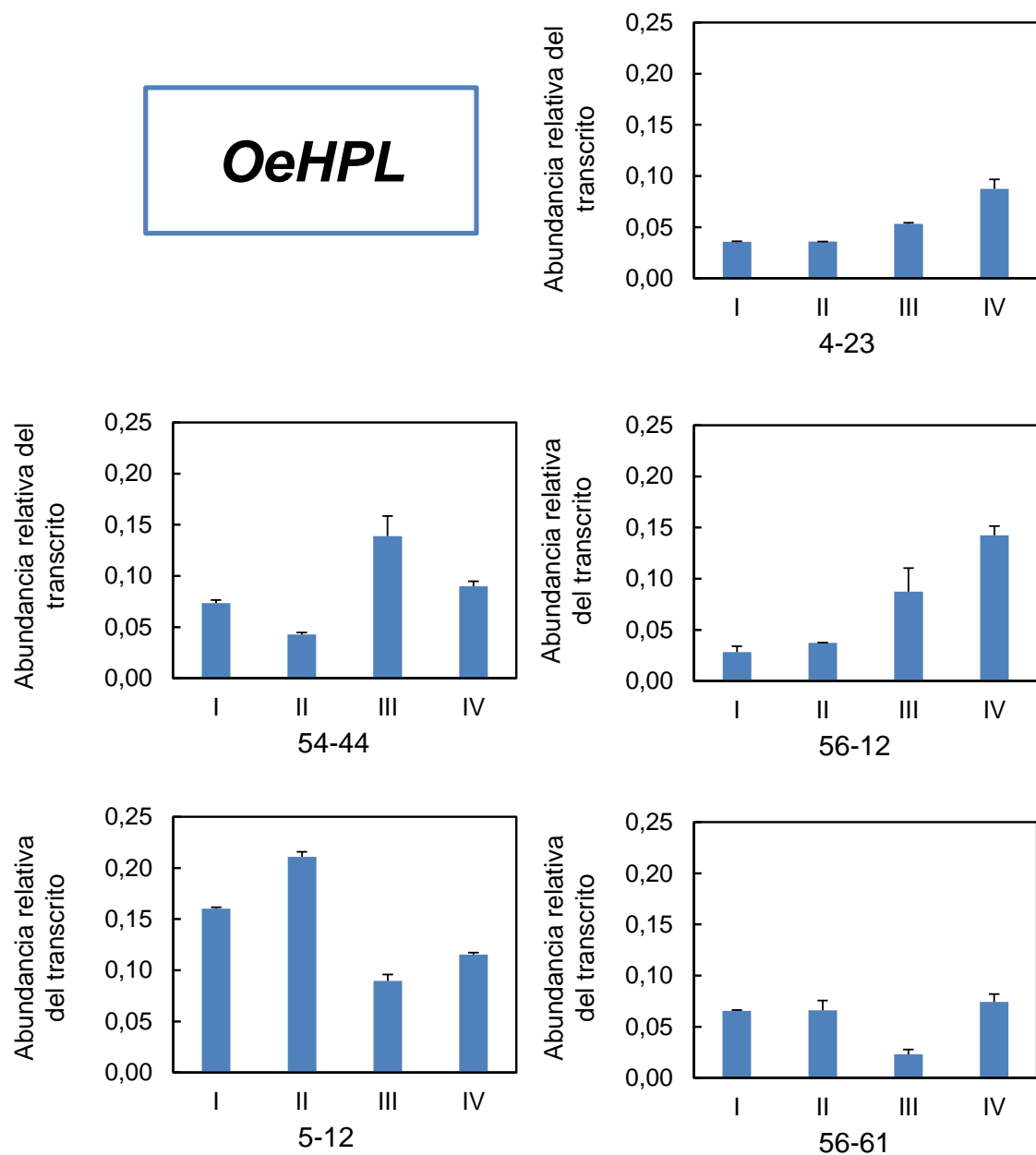


## ***Oe2LOX2***



## ***Oe3LOX2***





**Figura 28.** Evolución de los niveles de abundancia relativa del transcrito de los genes *Oe1LOX2*, *Oe2LOX2*, *Oe3LOX2* y *OeHPL* en mesocarpo de aceitunas de las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina durante el proceso de maduración del fruto. Los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.



#### **IV.5.5. Correlaciones entre metabolitos, actividad enzimática y expresión génica en las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina**

Se encontró una correlación significativa ( $p < 0,01$ ) entre el nivel de actividad LOX y el contenido de C6/LA ( $r = 0,63$ ), sin embargo, no se encontró correlación entre la actividad LOX y el contenido de compuestos C6/LnA (Tab. 13 A). De hecho, se observó una correlación negativa ( $r = -0,51$ ,  $p < 0,05$ ) entre el contenido en compuestos C6/LnA y el nivel de expresión del gen *Oe2LOX2*. Por otra parte, no se encontró una correlación significativa de ninguno de los principales grupos de compuestos volátiles sintetizados a través de la ruta LOX y la expresión de los correspondientes genes *LOX*.

Respecto a la actividad HPL sólo se encontraron valores de correlación significativa ( $p < 0,001$ ) con el contenido de compuestos C6/LA ( $r = 0,75$ ). La expresión del gen *OeHPL* correlaciona de manera también significativa con el nivel de compuestos C6/LA ( $r = 0,46$ ) y negativamente con el contenido de C6/LnA ( $r = -0,57$ ,  $p < 0,01$ ) (Tab. 13 A).

El nivel de actividad ADH presentó un nivel de correlación relativamente alto y significativo ( $p < 0,01$ ) sólo con el contenido en el alcohol C6/LA ( $r = 0,62$ ) (Tab. 13 B).

No se encontraron correlaciones significativas de la actividad AAT con el contenido en ésteres volátiles en los aceites.

En cuanto a la relación entre actividad enzimática y expresión génica (Tab. 13 C), no se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de actividad enzimática LOX y HPL y el nivel de expresión de los correspondientes genes. Tampoco se ha encontrado correlación entre la expresión del gen *OeHPL* con los genes *LOX2*. Sin embargo, es de destacar el relativamente alto grado de correlación entre las actividades LOX y HPL ( $r = 0,53$ ).

**Tabla 13. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre variables metabólicas, bioquímicas y moleculares de las líneas seleccionadas del cruzamiento Picual x Arbequina.**

**A**

	C6/LnA	C6/LA	C5/LnA	C5/LA
Actividad LOX	-0,34	0,63**	-0,13	0,10
<i>Oe1LOX2</i>	0,14	-0,18	0,03	-0,07
<i>Oe2LOX2</i>	-0,51 *	-0,07	-0,10	-0,06
<i>Oe3LOX2</i>	0,28	-0,51	0,09	-0,34
Actividad HPL	-0,35	0,75***	-0,04	0,35
<i>OeHPL</i>	-0,57 **	0,46 *	0,25	0,41

**B**

	Alcoholes C6/LnA	Alcoholes C6/LA	Carbonilos C5/LnA	Carbonilos C5/LA
Actividad ADH	-0,31	0,62 **	-0,27	-0,12

**C**

	Actividad LOX	<i>Oe1LOX2</i>	<i>Oe2LOX2</i>	<i>Oe3LOX2</i>	Actividad HPL
<i>Oe1LOX2</i>	-0,11				
<i>Oe2LOX2</i>	0,18	-0,07			
<i>Oe3LOX2</i>	-0,41	0,56	-0,17		
Actividad HPL	0,53 *	-0,10	0,09	-0,35	
<i>OeHPL</i>	0,11	0,02	0,43	-0,28	0,29

\* indica diferencia significativa para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  y \*\*\* para  $p < 0,001$ .

#### **IV.6. ESTUDIO DE GENÓMICA FUNCIONAL DE LA 13-HIDROPERÓXIDO LIASA DE OLIVO EN RELACIÓN A SU PAPEL EN LA BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES DEL ACEITE DE OLIVA**

Con objeto de analizar la posible función de la 13-hidroperóxido liasa (13-HPL) en la biosíntesis de compuestos volátiles responsables del aroma del aceite de oliva, el grupo del profesor D. Fernando Pliego de la Universidad de Málaga procedió a la obtención de plantas de olivo transformadas con dicho gen. Para ello, se generaron tres tipos de construcciones: una para la sobreexpresión del gen *OeHPL* (sentido), y dos para su silenciamiento (antisentido y RNA interferente o RNAi). Para obtener la construcción sentido (pHPLs), la región codificante completa del gen *OepHPL* se introdujo en orientación sentido en el plásmido pBin1935S que contiene un gen de resistencia al antibiótico kanamicina, y bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). En el caso de la construcción antisentido (pHPLas), un fragmento de 0,8 kb del extremo 5' de la región codificante de dicho gen se introdujo en orientación antisentido en el mismo plásmido pBin1935S. Finalmente, para generar la construcción RNAi (pHPLi), un fragmento de 0,3 kb de la región codificante del mismo gen *OepHPL* se introdujo en orientación sentido y antisentido en el vector pHannibal que contiene un gen de resistencia al antibiótico ampicilina, y bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Posteriormente, este plásmido fue introducido en el vector pART27 que contiene un gen de resistencia al antibiótico estreptomicina.

Una vez confirmadas las tres construcciones mediante secuenciación, se llevaron a cabo 6 eventos independientes de transformación siguiendo la técnica descrita por Torreblanca et al. (2010). En concreto, se transformaron callos embriogénicos de olivo con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* estirpe AGL1, previamente transformada con cada uno de los tres plásmidos pHPLs, pHPLas, y pHPLi. Para asegurar que el método utilizado para la transformación no producía alteraciones en la planta, se llevaron a cabo procesos de transformación equivalentes en callos embriogénicos de olivo usando el plásmido original sin inserto.

A continuación, se seleccionaron para posteriores experimentos 6, 10 y 11 líneas transgénicas a partir de las construcciones pHPLs (S), pHPLas (AS), y pHPLi (i), respectivamente. De la misma forma, se obtuvieron dos líneas transgénicas control (C).

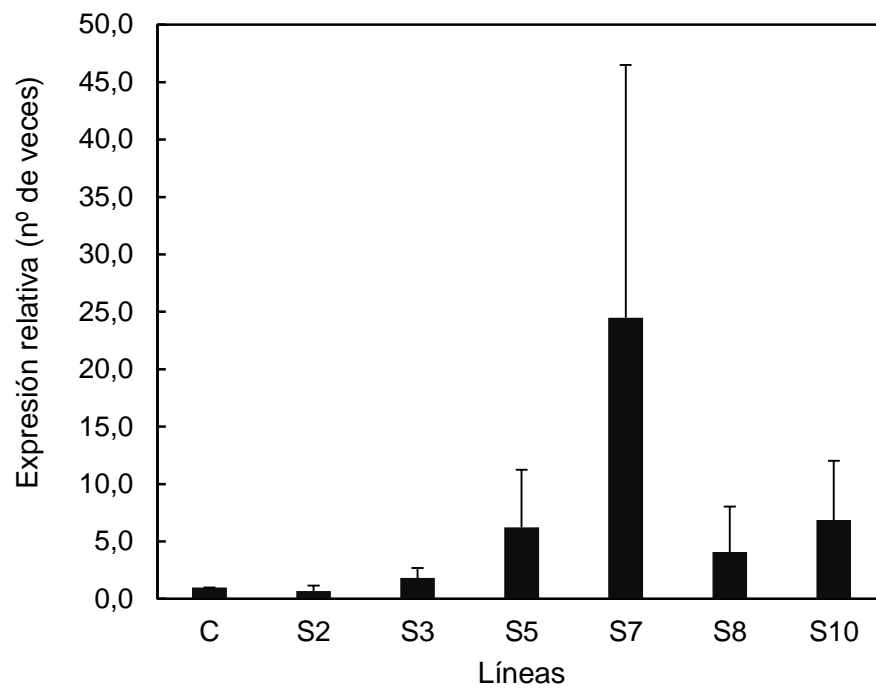
#### **IV.6.1. Caracterización de las plantas de olivo transformadas con el gen *OepHPL***

Tras la obtención de las distintas líneas transgénicas, se realizó una caracterización molecular, bioquímica y metabólica en relación con la 13-HPL en hojas de las plantas transformadas. Para ello se analizó por qRT-PCR el nivel de expresión del gen *OeHPL*, se midió la actividad enzimática 13-HPL y se realizó un análisis de compuestos volátiles a partir de homogeneizados procedentes de hojas, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

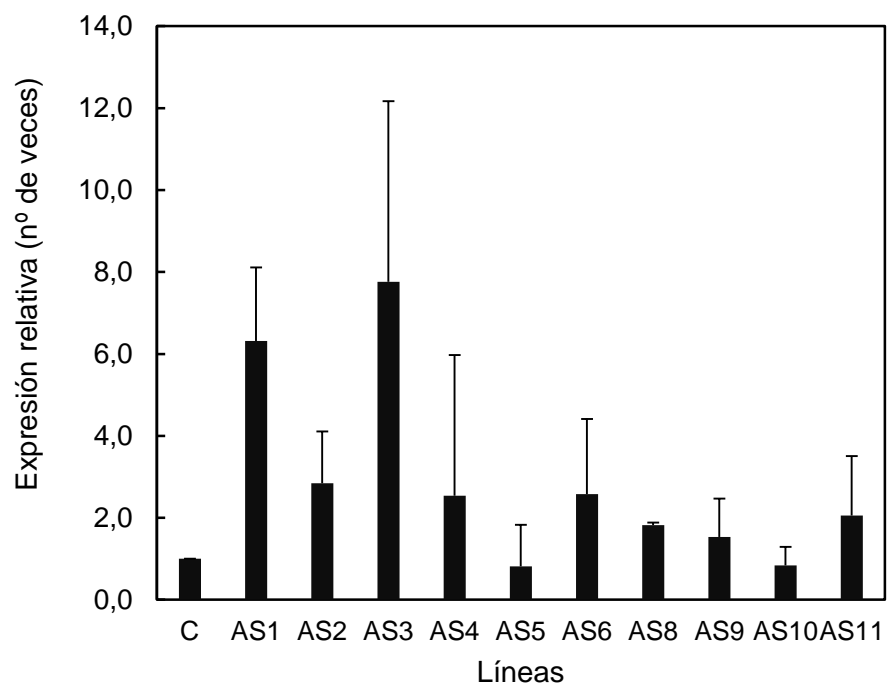
##### **IV.6.1.1. Niveles de expresión del gen *OeHPL***

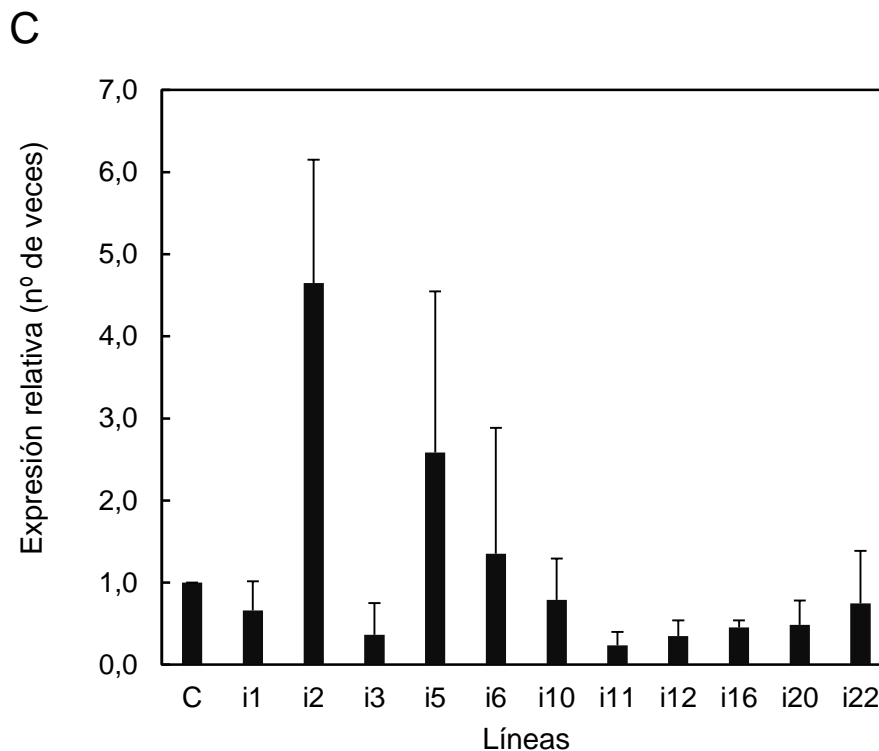
A partir de RNA total extraído de hojas de las distintas líneas transgénicas, se determinó el nivel de expresión del gen *OeHPL* mediante qRT-PCR. En el caso de las líneas transgénicas que sobreexpresaban dicho gen (Líneas S), se observó que, excepto en el caso de la línea S2, en el resto aumentaba el nivel de transcrito (Fig. 29A). De estas últimas, en las líneas S5, S7 y S10 se detectó un aumento significativamente mayor que en las líneas S3 y S8. Especialmente destacable es el caso de la línea S7, con un nivel de expresión 24 veces mayor que la línea control. Respecto a las líneas transgénicas que silenciaban el gen *OeHPL*, por un lado se observó que sólo en dos de las líneas antisentido (AS5 y AS10) se detectaba una reducción del nivel de transcrito hasta llegar a un 80% del nivel observado en las líneas control (Fig. 29B), mientras que en las líneas de RNAi (Líneas i) se detectó en todas ellas una disminución del nivel de expresión, excepto en el caso de las líneas i2, i5 e i6 (Fig. 29C). La línea i11 fue la que presentó una mayor reducción, detectándose sólo un 25% del nivel de transcrito con respecto a la línea control.

**A**



**B**





**Figura 29. Niveles de expresión relativa del gen *OeHPL* en hojas de líneas transgénicas de olivo.** A) Líneas que sobreexpresan el gen *OeHPL*, B) Líneas con el gen *OeHPL* silenciado mediante la técnica antisentido, C) Líneas con el gen *OeHPL* silenciado mediante la técnica de RNAi. Los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen *OeHPL* en la línea control, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

Además de las diferencias encontradas en cuanto al nivel de expresión relativa del gen *OeHPL*, también se observaron diferencias significativas en el fenotipo de algunas de las plantas de olivo transgénicas como puede observarse en la Fig. 30. Mientras que en las líneas sobreexpresante y antisentido no se detectaron diferencias apreciables respecto a la línea control, las líneas RNAi mostraban una severa reducción en su desarrollo.

A



B



C



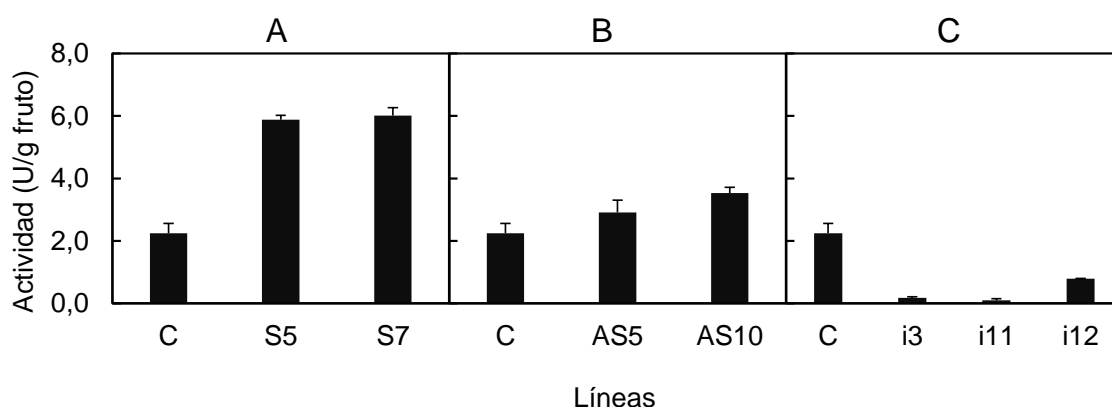
D



**Figura 30. Fenotipo de las líneas transgénicas de olivo. A) Línea control, B) Línea sobreexpresante S7, C) Línea antisentido AS5, D) Línea RNAi i11.**

#### IV.6.1.2. Niveles de actividad de la enzima HPL

A partir de los niveles de expresión del gen *OeHPL* mencionados en el apartado anterior, se seleccionaron aquellas líneas transgénicas que presentaban un mayor efecto respecto a la línea control, para medir los niveles de la actividad enzimática HPL en extractos crudos obtenidos a partir de hojas (Fig. 31). En las líneas transgénicas de olivo que sobreexpresaban el gen *OeHPL* se observó un aumento de la actividad enzimática HPL con respecto al control de aproximadamente 4 veces. En cambio, no se detectaron cambios significativos en las líneas antisentido. Por último, en las líneas RNAi se observó una fuerte disminución de la actividad HPL, especialmente en las líneas i3 e i11, que mostraban solamente un 10 % y un 5 %, respectivamente, respecto a la actividad HPL detectada en la línea control.



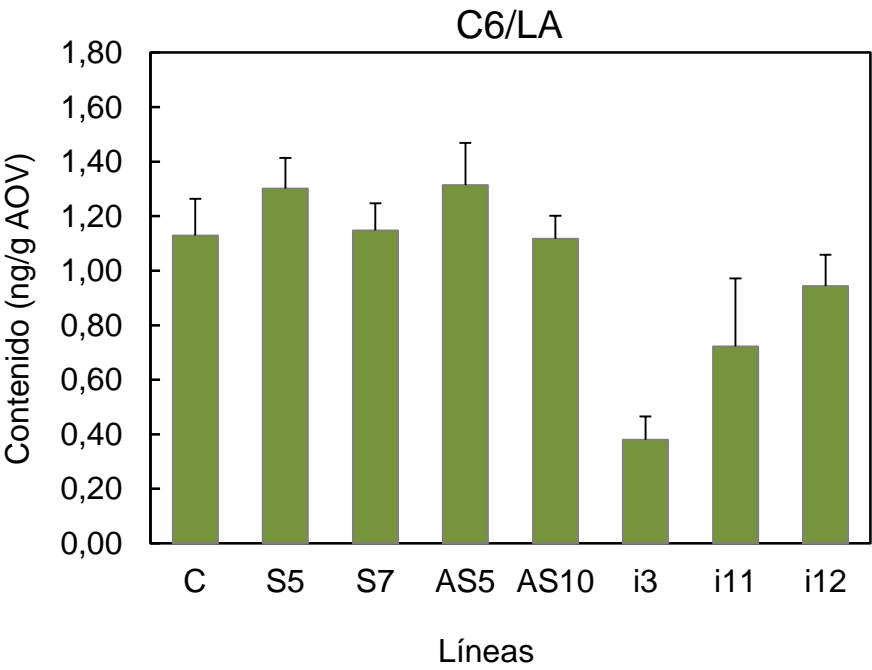
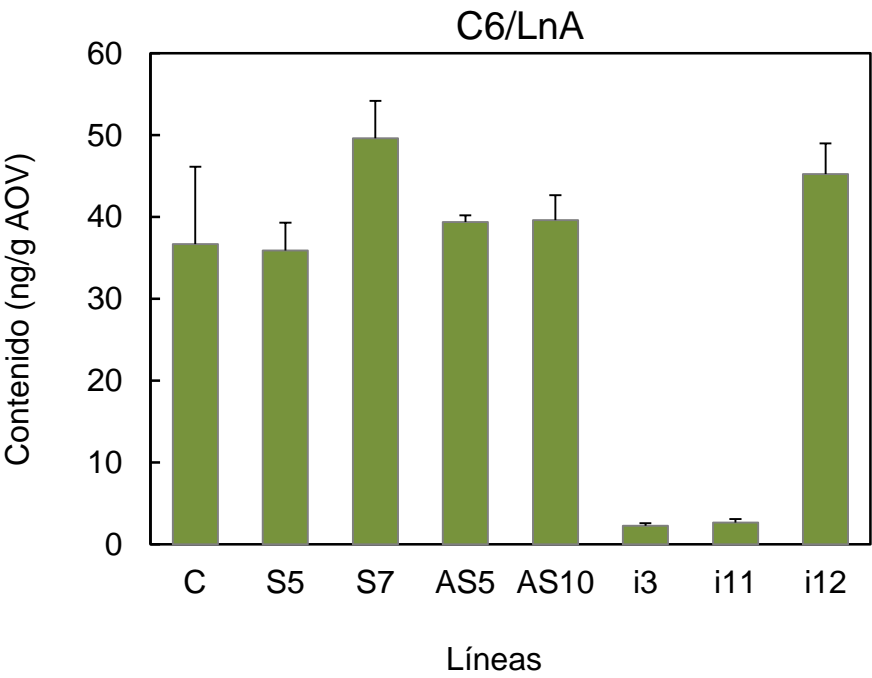
**Figura 31. Niveles de actividad enzimática HPL en hojas de líneas transgénicas de olivo.** A) Líneas que sobreexpresan el gen *OeHPL*, B) Líneas con el gen *OeHPL* silenciado mediante la técnica antisentido, C) Líneas con el gen *OeHPL* silenciado mediante la técnica de RNAi. La actividad enzimática se midió en extractos crudos obtenidos a partir de hojas como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

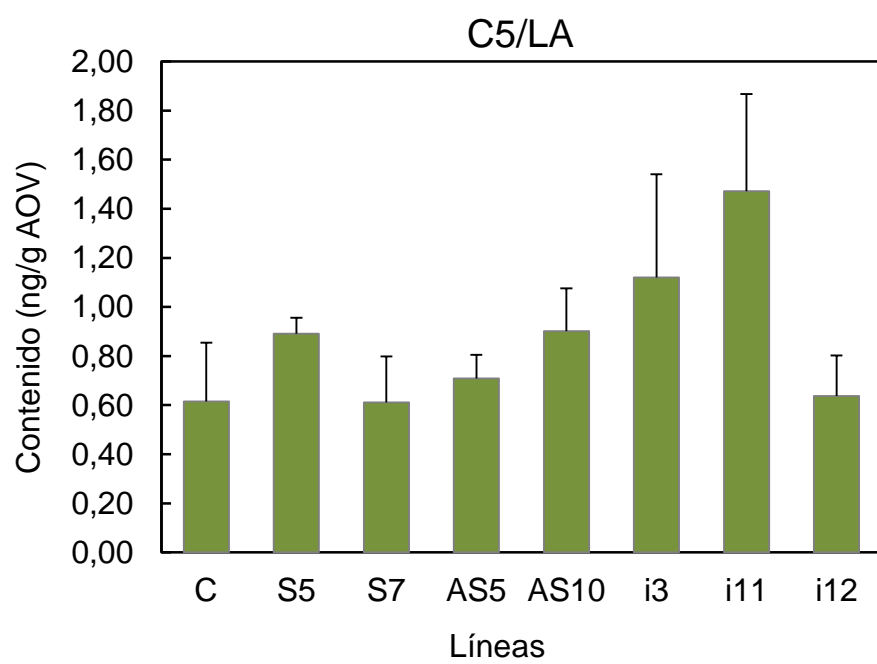
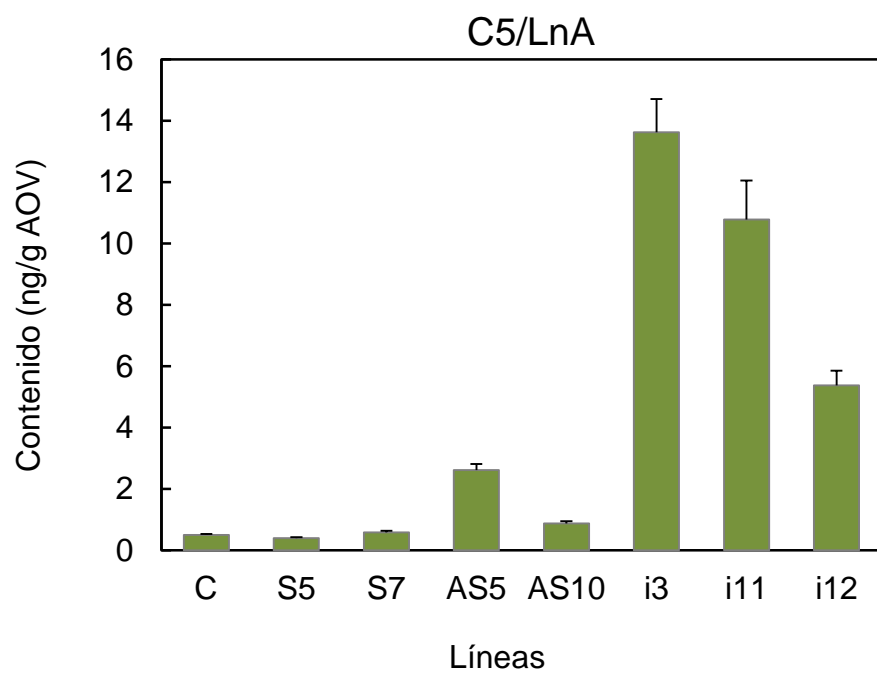
#### IV.6.1.3. Nivel de compuestos volátiles

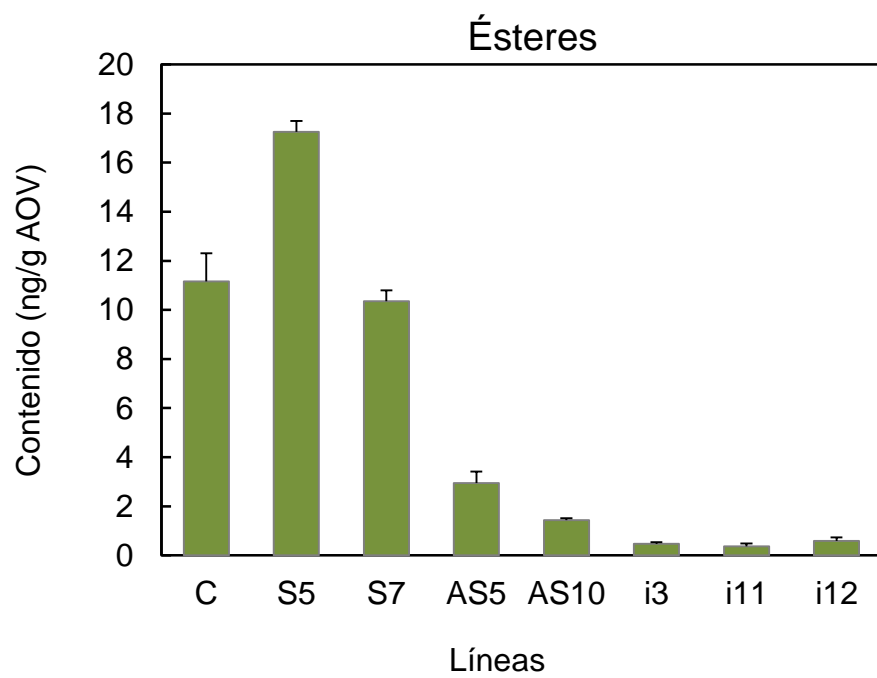
Las líneas que sobreexpresaban el gen *OeHPL* presentaban un ligero incremento en el contenido de compuestos volátiles con respecto al control (Fig. 32). Las líneas antisentido sólo sufrieron cambios significativos en el contenido de ésteres, que mostraron un fuerte descenso. Sin embargo, el análisis de compuestos volátiles obtenidos a partir de homogeneizados de las hojas reveló un importante descenso de los compuestos C6/LnA en las líneas de olivo silenciadas por RNA interferente con respecto al control y un aumento significativo del contenido en compuestos C5/LnA.



Curiosamente, la línea 12 procedente de la transformación con RNAi también mostraba el incremento en compuestos C5/LnA pero no presentaba descenso de los C6/LnA.







**Figura 32. Contenido de compuestos volátiles en hojas de líneas transgénicas de olivo.** Los volátiles se analizaron en homogeneizados obtenidos a partir de hojas, según se indica en Materiales y Métodos.



## **V. Discusión**



## V. DISCUSIÓN

El aroma del AOV está constituido por una compleja mezcla de compuestos volátiles sintetizados durante el proceso tecnológico de elaboración de este producto. Aunque los principales aspectos relacionados con la síntesis del aroma del AOV han sido revisados por diversos autores (Olías et al., 1993; Angerosa et al., 2002, 2004; Kalua et al., 2007) son escasos, sin embargo, los estudios conjuntos de metabolitos, y enzimas y genes responsables de esta síntesis, siendo éste el objetivo principal del presente trabajo de investigación.

La primera aproximación experimental de este trabajo consistió en el aislamiento de un nuevo gen *LOX* de olivo, distinto de los previamente descritos *Oe1LOX1* (Palmieri-Thiers et al., 2009), *Oep2LOX1* (Padilla et al., 2012a), y *Oep1LOX2* y *Oep2LOX2* (Padilla et al., 2009). El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de *Oep3LOX2* (Fig. 10) reveló la existencia de regiones altamente conservadas en LOXs de plantas entre las que se encuentran los dominios implicados en el enlace al sustrato y al oxígeno, así como el dominio C-terminal (Siedow, 1991; Boyington et al., 1993). Además, el análisis de dominios conservados realizado con el programa del NCBI y con el programa Pfam en la secuencia identificó la presencia de un dominio PLAT N-terminal y un dominio típico LOX. La nueva LOX de olivo clonada en este trabajo muestra también los residuos conservados esenciales (tres histidinas, una asparraguina, y una isoleucina) para el enlace del átomo de hierro del sitio activo de las enzimas LOX (Minor et al., 1993, 1996). *Oep3LOX2* muestra también un residuo de fenilalanina, al igual que *Oep1LOX2* y *Oep2LOX2* (Padilla et al., 2009), típico de las LOXs con actividad 13-LOX (Hornung et al., 1999). También se encontró tanto el residuo conservado de arginina, que interacciona con el grupo carboxilo del ácido graso y es determinante para la orientación inversa del sustrato en las LOXs de plantas (Hornung et al., 1999), como el residuo de alanina que determina la estereoespecificidad *S* de las LOXs (Coffa y Brash, 2004).

En cuanto a la localización subcelular, *Oep3LOX2* presentaba una extensión en el extremo N-terminal con un posible sitio de corte (TSA↓A) (Fig. 10) que se localizaría tentativamente de acuerdo con el motivo conservado (V/I-X-A/C↓A) (Gavel y von Heijne, 1990). Esta extensión daría lugar a un péptido señal de 55 aminoácidos. Además, el programa ProtComp también predice una localización cloroplástica del gen

*Oep3LOX2*. La proteína madura, tras el procesamiento proteolítico del péptido señal, estaría formada por 860 aminoácidos, con una masa molecular de 97,9 kDa y un pI de 6,85.

El análisis filogenético del gen estableció que *Oep3LOX2* se situaba junto a las LOXs de tipo 2 (cloroplásticas) y actividad 13-LOX (Fig. 11). Además, reveló que filogenéticamente *Oep3LOX2* estaba más próximo a *Oep1LOX2* que a *Oep2LOX2*.

A continuación, se llevó a cabo el análisis de su expresión relativa en diferentes tejidos de olivo como drupa joven, mesocarpo, semilla de aceitunas, y hoja, para investigar su papel fisiológico. Los resultados mostraron que el gen *Oe3LOX2* presentaba distintos niveles de expresión en los tejidos estudiados (Fig. 12), poniendo de manifiesto la regulación espacial que posee la expresión de este gen. También se observaron cambios en los niveles de expresión relativa detectados en mesocarpo y semilla a lo largo del desarrollo y la maduración del fruto (Fig. 13 y 14), revelando una regulación temporal de la expresión del gen *Oe3LOX2*.

En cuanto a la posible función fisiológica del gen *Oe3LOX2*, se observó que su nivel de expresión en mesocarpo desciende a lo largo del desarrollo y maduración del fruto hasta hacerse prácticamente indetectable. El gen *LOX2* con mayor similitud de secuencia a *Oe3LOX2* del que se conoce su función es el gen de *Arabidopsis AtLOX6* (*At4LOX2*; (Grebner et al., 2013). Dicho gen se induce por herida en raíces y está implicado en la síntesis de jasmonatos. Por su parte, los genes homólogos de *Oe3LOX2* en tomate *TomloxD* (*Le2LOX2*; Heitz et al., 1997) y patata *LOX H3* (*St2LOX2*; Royo et al., 1996) presentan una expresión basal y se inducen por herida y jasmonato de metilo.

Los datos de actividad LOX existentes a partir de extractos crudos de mesocarpo de aceituna a lo largo del desarrollo y la maduración para la variedad Picual muestran un descenso de la actividad en torno a 30 SDF (Salas et al., 1999). En Arbequina, sin embargo, los datos de actividad LOX parecen no decaer en este estadio de maduración (Criado et al., 2006). Al igual que ocurría con *Oe1LOX2* (Padilla et al., 2009), este perfil de actividad LOX no correlaciona con el perfil de expresión que presenta *Oe3LOX2* en mesocarpo de estas dos variedades a lo largo del desarrollo y maduración, sugiriendo de igual forma que se trata de una isoenzima LOX2 que no contribuye significativamente a la actividad LOX en el mesocarpo de aceituna. Por el contrario,

estos datos confirman a *Oe2LOX2* como la isoenzima mayoritaria que contribuye a la actividad LOX en dicho tejido (Padilla et al., 2009).

En trabajos anteriores de nuestro grupo se determinó el contenido de los principales compuestos volátiles en aceites obtenidos con aceitunas en distintos estadios a lo largo de la maduración del fruto (Padilla et al., 2009). En ambas variedades se observaba un incremento del contenido de compuestos volátiles al inicio de maduración que decae al final, cuando se alcanzan los estadios más maduros (35 SDF). Esta evolución del contenido de compuestos volátiles no correlaciona con el perfil de expresión de *Oe3LOX2* apuntando, de nuevo, a que *Oe2LOX2* sea el principal responsable en la biosíntesis de los compuestos que determinan el aroma del AOV tal como se había propuesto previamente (Padilla et al., 2009).

Respecto a la semilla, el gen *Oe3LOX2* presentó bajos niveles de transcrito a lo largo del desarrollo y maduración del fruto, tanto en la variedad Picual como en Arbequina (Fig. 14), al igual que ocurría con los demás genes *LOX2* de olivo (Padilla et al., 2009). En semilla no se ha detectado actividad LOX, lo que está de acuerdo con los bajos niveles de expresión de los genes *LOX* encontrados en ambas variedades. Se ha propuesto que la participación de la semilla en la biosíntesis de compuestos volátiles del AOV es secundaria respecto al mesocarpio, estando principalmente relacionada con la biosíntesis de alcoholes y ésteres a través del aporte de actividad ADH y AAT durante el proceso de obtención de este producto (Luaces et al., 2003).

Aunque tradicionalmente el cultivo del olivo se ha llevado a cabo en condiciones de secano, recibiendo únicamente el agua de lluvia, en los últimos años ha aumentado de forma importante el número de olivares en regadío debido al efecto positivo que tiene sobre la producción incluso con pequeñas cantidades de agua. Sin embargo, los diferentes regímenes hídricos pueden modificar la composición y calidad del AOV. Estudios realizados en otras variedades de olivo revelan una influencia diferencial del régimen hídrico sobre la composición de volátiles del aceite de oliva. Así, se ha observado en Cornicabra un incremento en la cantidad de (*E*)-hex-2-enal cuando aumentaba la cantidad de agua aplicada al cultivo (Gómez-Rico et al., 2006), mientras que en la variedad Leccino se ha descrito un ligero descenso en la concentración de compuestos volátiles en secano en aceitunas verdes que no ha sido observado en aceitunas maduras (Servili et al., 2007). También en la variedad Frantoio se ha



encontrado un aumento en el contenido de nonanal como consecuencia de un mayor aporte hídrico (Benelli et al., 2015). En las dos variedades utilizadas en este estudio, Picual y Arbequina, el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2* mostró un incremento en el mesocarpo de aceitunas cultivadas en secano (Fig. 19), menos acusado en Arbequina que en Picual. Resultados similares se observaron para el gen *Oe2LOX2* (Padilla et al., 2014). En otras plantas, como soja, también se ha descrito un incremento transitorio de los transcritos de dos genes *LOX* en el hipocotilo de plántulas cuando se someten a estrés hídrico (Bell y Mullet, 1991). De forma similar, se ha observado un aumento en el nivel de expresión de un gen *LOX2* de judía, tanto en hipocotilos como en semillas germinadas, cuando ambos tejidos son sometidos a condiciones de sequía (Porta et al., 1999). Además, durante el desarrollo y maduración de uvas sometidas a déficit hídrico también se detectó el aumento de transcritos de dos genes *LOXs* (Deluc et al., 2009). Esta inducción podría estar relacionada con el deterioro de las membranas celulares que ocurre en condiciones de déficit de agua. Este déficit podría promover un incremento de la actividad *LOX* y del contenido de hidroperóxidos en los lípidos de membrana, provocando daños en su estructura (Maccarrone et al., 1995).

Se ha estudiado también el efecto de distintos estreses abióticos, como temperatura baja y alta, oscuridad y daño por herida, sobre los niveles de expresión relativa del gen *Oe3LOX2*, en las variedades Picual y Arbequina. La incubación a temperatura baja (15 °C) de ramas de olivo con aceitunas provocó un aumento en los niveles de expresión relativa del gen principalmente al inicio del tratamiento, para luego descender progresivamente hasta valores iniciales. Este comportamiento frente a la temperatura baja también se había observado previamente para los genes *Oe1LOX2* y *Oe2LOX2* (Padilla et al., 2014). En ese mismo estudio también se determinó en la variedad Arbequina la actividad enzimática *LOX* a baja temperatura, que mostró el mismo comportamiento que la expresión génica. Sin embargo, no se observó un efecto claro en el contenido de compuestos volátiles, por lo que la limitación de sustrato podría ser un factor importante que afecta a la síntesis de compuestos volátiles durante la elaboración del AOV (Sánchez-Ortiz et al., 2007).

El incremento transitorio en los niveles de transcrito de una 13-*LOX* en respuesta a bajas temperaturas también se ha descrito en el caso de hojas de maíz y *Caraganata jubata* incubadas a 4 °C, para los genes *ZmLOX10* (Nemchenko et al., 2006) y *CjLOX* (Bhardwaj et al., 2011), respectivamente. De igual manera, la

germinación de semillas de judía a 4 °C da lugar a un incremento en el nivel de expresión de un gen *LOX2* (Porta et al., 1999). Respecto a una posible explicación fisiológica para los aumentos de los niveles de transcrito y actividad LOX observados en plantas sometidas a bajas temperaturas, se ha propuesto a la peroxidación lipídica mediada por LOX como una fuente de especies reactivas de oxígeno, especialmente bajo condiciones de estrés (Blokhina et al., 2003). Asimismo, en tejidos vegetativos tales como raíces, este fenómeno se ha asociado con tolerancia a frío (Lee et al., 2015).

Cuando la incubación se realizó a alta temperatura (35 °C), el efecto detectado fue un rápido descenso en los niveles de expresión del gen *Oe3LOX2*, tal como se había descrito previamente para los genes *Oe1LOX2* y *Oe2LOX2* (Padilla et al., 2014). Del mismo modo, se ha observado una disminución en los niveles de expresión de un gen *LOX* de frutos de banana cuando éstos se incubaban a 30 °C (Yang et al., 2011).

Por otra parte, el tratamiento con oscuridad de los frutos de la variedad Picual y Arbequina no provocó cambios significativos en el nivel de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* (Fig.17), a diferencia de lo observado previamente en los genes *Oe1LOX2* y *Oe2LOX2*, donde se detectó un descenso en los niveles de transcrito (Padilla et al., 2014). En maíz se ha descrito un gen 13-LOX (*ZmLOX10*; Nemchenko et al., 2006) que posee las características de un gen regulado por ciclo circadiano y no por luz, ya que mantiene el mismo patrón de expresión cíclica cuando las plantas se transferían desde un fotoperiodo de 12 h luz / 12 h oscuridad a oscuridad constante.

Finalmente se estudió el efecto que el daño por herida tiene sobre el nivel de expresión relativa del gen *Oe3LOX2* en el mesocarpo de aceituna de las variedades Picual y Arbequina (Fig. 19). Se observó una inducción transitoria de dicho gen en ambas variedades estudiadas, siendo ésta más acusada en Picual que en Arbequina. Este resultado indica que el papel fisiológico del gen está relacionado con la respuesta a herida, tal como se ha descrito para el gen *Oe1LOX2* (Padilla et al., 2014). Como se ha mencionado anteriormente, este efecto se ha encontrado para sus genes homólogos en *Arabidopsis AtLOX6* (*At4LOX2*; Grebner et al., 2013), tomate *TomloxD* (*Le2LOX2*; Heitz et al., 1997) y patata *LOX H3* (*StLOX2*; Royo et al., 1996).

En un estudio previo similar (Padilla et al., 2014), los niveles de actividad LOX medidos en extractos crudos obtenidos de mesocarpo de aceitunas de la variedad Arbequina sometidas a daño por herida mostraron un incremento a tiempos cortos de

acuerdo con el aumento del nivel de expresión observado. Este aumento de actividad enzimática dio lugar a un leve incremento de la cantidad de compuestos C6 procedentes de LnA a los 30 min de tratamiento, indicando su relevancia fisiológica.

En definitiva, el análisis de la secuencia del gen *Oe3LOX2*, junto con el estudio de la regulación de sus niveles de expresión, tanto en distintos tejidos de olivo, como en mesocarpio de aceitunas sometidas a distintos estreses abióticos, sugieren que dicho gen no contribuye mayoritariamente a la biosíntesis de los compuestos que determinan el aroma del AOV. Por el contrario, *Oe3LOX2* parece estar implicado en la respuesta a herida pudiendo participar en la biosíntesis de jasmonatos, tal como se ha propuesto previamente para el gen *Oe1LOX2* (Padilla et al., 2014).

Con el objetivo de seleccionar variedades de olivo cuyos aceites se caracterizaran por tener diferentes perfiles de la fracción volátil, se estudió la composición de compuestos volátiles de los aceites producidos por una colección de 36 variedades (CN-36) procedentes del BMGO, que recoge la mayor parte de la variabilidad genética de este banco (Belaj et al., 2012). Los aceites de la CN-36 presentaron un alto nivel de variabilidad en cuanto al contenido en compuestos volátiles (Fig. 20), mayor que el encontrado por Luna et al. (2006b) para aceites procedentes de 39 variedades diferentes de olivo, sin embargo, fue ligeramente menor que el encontrado para la progenie procedente de un cruzamiento de dos variedades de la colección, Picual y Arbequina (Pérez et al., 2016).

El principal grupo de compuestos volátiles en los aceites estudiados fueron los compuestos C6/LnA. El (*E*)-hex-2-enal fue el compuesto más importante (representando un 89 % del total de C6/LnA), con un contenido medio de 18,52 µg/g de aceite, similar al valor obtenido para la fracción volátil de la progenie procedente del cruzamiento Picual x Arbequina (Pérez et al., 2016). Estos compuestos contribuirían de manera principal al aroma de los aceites de oliva de las variedades CN-36 debido a su alta concentración, lo cual parece ser una característica general del AOV (Pérez et al., 2016), y a su bajo umbral de detección (Tab. 8). El segundo grupo de compuestos más abundante fueron los C5/LnA, pero su contribución al aroma del AOV es importante debido al bajo umbral de detección de los mismos (Tab. 8). El contenido en ésteres sintetizados a través de la ruta LOX presente en los aceites tiene una gran importancia comercial ya que, aunque su contenido medio es menor que el de los grupos C6 y

C5/LnA, son los responsables de las notas afrutadas presentes en el aroma del AOV. Los datos obtenidos para los ésteres LOX pueden compararse a los obtenidos por Pérez et al. (2016) para la progenie procedente del cruzamiento de Picual x Arbequina.

A pesar de la importante contribución de los ésteres LOX y los aldehídos BC en el aroma del AOV, estos dos grupos de compuestos presentaron coeficientes de correlación muy bajos en relación al total de compuestos volátiles, lo que da idea de su bajo nivel de representatividad en el conjunto de la fracción volátil del AOV. Los compuestos BC no comparten ninguna ruta biosintética con el resto de compuestos volátiles, por lo que es lógico desde un punto de vista metabólico que no presente correlaciones significativas con ningún otro grupo de compuestos volátiles. Esto no ocurre en el caso de los ésteres LOX, que presentan un coeficiente de correlación moderado con los alcoholes C6/LA, pero mucho menor con sus precursores principales, los alcoholes C6/LnA. Estos datos sugieren que la actividad AAT es un factor limitante en la síntesis de los ésteres LOX, o bien que la síntesis de alcoholes por la ADH durante la producción del AOV está en general inhibida en las variedades CN-36, como se ha demostrado que ocurre con dos variedades de esta colección, Arbequina y Picual (Sánchez-Ortiz et al., 2012a). En este sentido, aunque se encontró una alta correlación entre los alcoholes C6/LA y C6/LnA, sugiriendo el mismo origen bioquímico, se observó una baja correlación entre el contenido de aldehídos C6/LnA y sus productos metabólicos, los alcoholes C6/LnA. Esta baja correlación también se encontró para el contenido de aldehídos C6/LA y alcoholes C6/LA.

Por otra parte, la baja pero significativa correlación observada entre el contenido de los carbonilos C5/LnA y los alcoholes C5/LnA, bastante similar a la encontrada para estos grupos de compuestos con los dímeros de penteno, sugiere que estos compuestos podrían estar metabólicamente relacionados, tal y como describe Pérez et al. (2016) para la progenie procedente del cruzamiento Picual x Arbequina y, por tanto, apoya la hipótesis de que la síntesis de alcoholes C5 y dímeros de penteno ocurre simultáneamente catalizados por la misma actividad LOX (Angerosa et al., 1998).

La variabilidad encontrada en términos de compuestos volátiles se traduce en una elevada variabilidad de la calidad aromática entre los distintos aceites obtenidos de la CN-36. Esta variabilidad en cuanto al aroma de los AOVs sugiere que la colección nuclear CN-36 podría ser una herramienta útil para la búsqueda de parentales en

programas de mejora en relación a la obtención de líneas con calidad de aceite optimizada.

El análisis de componentes principales (Fig. 21) mostró que los compuestos C6 y C5 derivados del LnA se agrupaban juntos en el gráfico, mientras que los compuestos C6 y el pentan-1-ol (C5) derivados del LA se situaban bastante separados de los aldehídos y compuestos C6 y C5 derivados del LnA. Esto también lo observaron Pérez et al. (2016) para la progenie procedente del cruzamiento Picual x Arbequina. La síntesis de estos compuestos podría deberse a una mezcla de procesos de oxidación de carácter tanto químico como bioquímico, en este último caso a través de la ruta LOX. En este sentido, Kalua et al. (2006) propusieron que la formación de hexanal durante la extracción del AOV podría deberse tanto a síntesis enzimática como no enzimática.

La presencia de los alcoholes C6, derivados tanto de LnA como de LA, alejados en el gráfico podría explicarse por la baja correlación encontrada por estos grupos de compuestos, probablemente debido a una inactivación de la enzima ADH durante el proceso de extracción del AOV (Sánchez-Ortiz et al., 2012a). Los ésteres se agruparon junto con sus precursores metabólicos sintetizados a través de la ruta LOX, lo que sugiere, en términos generales, que la actividad AAT no es un factor limitante en las variedades de la CN-36 y que sólo la limitación de la actividad ADH durante el proceso de extracción del aceite podría ser el responsable de la correlación moderada entre ésteres y alcoholes C6.

Los compuestos BC se agruparon lejos del resto de compuestos sintetizados por la ruta LOX, indicativo de su diferente origen metabólico.

Según Angerosa et al. (1999), el nivel de carga enzimática de las diferentes enzimas que participan en la ruta LOX difiere para cada variedad durante el proceso de elaboración del AOV y sería el responsable de las diferencias que se encuentran en el perfil de compuestos volátiles del aceite de las distintas variedades de aceituna. Estas diferencias en la composición de la fracción volátil del aceite han permitido caracterizar los aceites desde el punto de vista varietal (Luna et al., 2006b). El perfil volátil característico de cada variedad sería modulado a lo largo de la maduración del fruto en función de diversos factores entre los que se encuentran los niveles de actividad de las enzimas implicadas en la ruta LOX (Angerosa y Basti, 2001; Gómez-Rico et al., 2006). Para confirmar esta hipótesis y profundizar en el conocimiento de la implicación de la

ruta de la LOX en relación a la síntesis de los componentes que determinan el aroma del AOV, se ha realizado un estudio de la biosíntesis de compuestos volátiles en siete variedades de olivo seleccionadas en función del contenido total de compuestos en la fracción volátil de los aceites de la CN-36 (Tab. 9).

En términos generales, en las siete variedades analizadas, se observó un aumento en el contenido total de compuestos volátiles a medida que se produce la maduración del fruto. Este aumento va acompañado de un incremento en la actividad LOX, así como de un mayor nivel de expresión del gen *Oe2LOX2*, lo que confirma lo descrito anteriormente por Padilla et al. (2009) en cuanto a que *Oe2LOX2* sería el principal gen responsable de la síntesis de compuestos volátiles en aceituna.

En relación a la actividad LOX, sólo se encontró una correlación significativa con el contenido de compuestos volátiles C6/LA (Tab. 10 A), que es comparable a la correlación encontrada con el nivel de expresión del gen *Oe3LOX2*, pero no se encontró correlación de la actividad LOX con el contenido de C6/LnA. Estos datos ponen de manifiesto que existen otros factores limitantes en la biosíntesis del aroma del AOV más allá del nivel de actividad LOX. En este sentido, el nivel de actividad LOX se ve muy afectado por la presencia de ciertos compuestos presentes en el fruto, principalmente compuestos de naturaleza fenólica (Dohi et al., 1991). Según Sánchez-Ortiz et al. (2007), uno de los principales factores limitantes en la síntesis de la fracción volátil del AOV es la disponibilidad de los ácidos grasos poliinsaturados libres, LnA y LA, sustratos de la reacción de la LOX, que depende de la variedad. Más concretamente, el factor limitante del contenido final de compuestos C6/LnA es la disponibilidad de LnA libre durante el proceso de obtención del aceite. Por término medio, el porcentaje de LnA en los triglicéridos es de alrededor del 1%, muy por debajo de la media encontrada para el LA en la CN-36 (13 %).

La correlación negativa encontrada entre el contenido en compuestos C5/LnA y C5/LA y el nivel de expresión relativa del gen *Oe2LOX2* pone de manifiesto que la isoenzima *Oe2LOX2* no estaría implicada en la síntesis de compuestos C5, como ya se ha sugerido en estudios anteriores (Padilla et al., 2012b).

Respecto a la actividad HPL, no se encontraron correlaciones significativas con el contenido de ninguna clase de compuestos volátiles en particular. Se encontraron incluso valores de *r* negativos como el caso del contenido de C6/LA (Tab. 10 A),

sugiriendo una inhibición por producto sobre la actividad HPL durante el proceso de obtención del AOV.

El nivel de actividad ADH presentó una alta correlación con sus productos de reacción en la ruta LOX, los alcoholes C6/LnA, carbonilos C5/LnA y carbonilos C5/LA (Tab. 10 B). Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas de la actividad AAT con el contenido en ésteres presentes en la fracción volátil del AOV.

En cuanto a la relación entre actividad enzimática y expresión génica, se observó, en general, un bajo nivel de correlación, no significativa ( $p < 0,05$ ), entre la actividad enzimática LOX y HPL y el nivel de expresión de los correspondientes genes (Tab. 10 C). Para el caso de la actividad LOX, la falta de correlación podría explicarse en base a que aunque en este trabajo se han determinado los niveles de expresión de genes *LOX* que codifican isoenzimas con actividad 13-LOX, que son las implicadas en la síntesis de la fracción volátil del AOV, el ensayo enzimático no distingue entre actividad 9-LOX y 13-LOX. De hecho, la población dominante de las proteínas LOX en la pulpa de la aceituna es la correspondiente a la actividad 9-LOX (Olías et al., 1993), que no participa aparentemente en la síntesis de la fracción volátil del AOV. Aun así, se encontró correlación entre la actividad LOX y la expresión del gen *Oe3LOX2*, siendo destacable la baja correlación con *Oe2LOX2*, cuyo nivel de expresión es el mayor entre los genes LOX. Esta aparente contradicción sugiere la posible presencia de mecanismos que regulan la actividad LOX, como aquellos relacionados con diferencias en estabilidad de las correspondientes proteínas durante el proceso de obtención del AOV (Luaces et al., 2007), que ya se ha comprobado con anterioridad con las proteínas recombinantes (Padilla et al., 2012b). Por otra parte, no se observó correlación entre la actividad LOX y el nivel de expresión del gen *Oe1LOX2*. Esto apuntaría a cierto nivel de participación del gen *Oe3LOX2* en la síntesis del aroma del AOV, junto a la relevancia ya establecida en estudios anteriores del gen *Oe2LOX2* (Padilla et al., 2009).

Como se ha comentado anteriormente, no observó correlación entre la actividad HPL y el nivel de expresión del único gen *HPL* que existe en aceituna, lo que podría ser debido a la diferencia temporal que existe entre la transcripción del gen y la traducción del correspondiente mRNA a proteína. Sin embargo, se encontró un relativamente alto y significativo grado de correlación de la expresión del gen *OeHPL* con los genes *Oe2LOX2* y *Oe3LOX2* (Tab. 10 C), indicando una coregulación transcripcional de

estos genes, como se ha demostrado que ocurre en los cloroplastos de patata (Farmaki et al., 2007).

Además del estudio de la CN-36, se llevó a cabo un estudio con una colección de genotipos de olivo que muestran teóricamente una mayor homogeneidad genética dado que provenían de la progenie de un cruzamiento Picual x Arbequina (Pérez et al., 2016). A partir de los datos obtenidos de este análisis, se seleccionaron cinco genotipos que presentaban características diferentes en cuanto al contenido en compuestos volátiles.

Como se observó en el estudio de las variedades seleccionadas de la colección CN-36, se encontró una correlación significativa ( $p < 0,01$ ) entre el nivel de actividad LOX y el contenido de C6/LA (Tab. 13 A). También como ocurría con las variedades, sorprende que no exista correlación de la actividad LOX con el contenido de compuestos C6/LnA. En este sentido, se ha encontrado de nuevo una correlación negativa entre el contenido en compuestos C6/LnA y el nivel de expresión del gen *Oe2LOX2*. Por otra parte, a diferencia de lo encontrado con el estudio de las variedades, no se ha observado una correlación significativa de ninguno de los principales grupos de compuestos volátiles sintetizados a través de la ruta LOX y la expresión de los correspondientes genes *LOX*, lo que podría indicar la escasa contribución del gen *Oe3LOX2* a la síntesis de la fracción volátil del AOV en la progenie del cruzamiento Picual x Arbequina e incluso en los mismos parentales.

Respecto a la actividad HPL, sólo se han encontrado valores de correlación significativa ( $p < 0,001$ ) con el contenido de compuestos C6/LA.

El nivel de actividad ADH (Tab. 13 B) presentó un nivel de correlación relativamente alto y significativo con el alcohol C6/LA, lo que coincide en tendencia con lo encontrado para las variedades. Sin embargo, difiere considerablemente para el caso de los compuestos C5 cuya síntesis en homogeneizados de mesocarpo está fuertemente reducida respecto al proceso de obtención del AOV.

Tampoco, como en el caso de las variedades de la CN-36, se encontraron correlaciones significativas de la actividad AAT con el contenido en ésteres volátiles en los aceites, aunque en este caso no se esperaban correlaciones significativas ya que la



mayor parte de la actividad AAT se encuentra en semilla (Luaces et al., 2003) y estos análisis se realizaron sobre homogeneizados de mesocarpo.

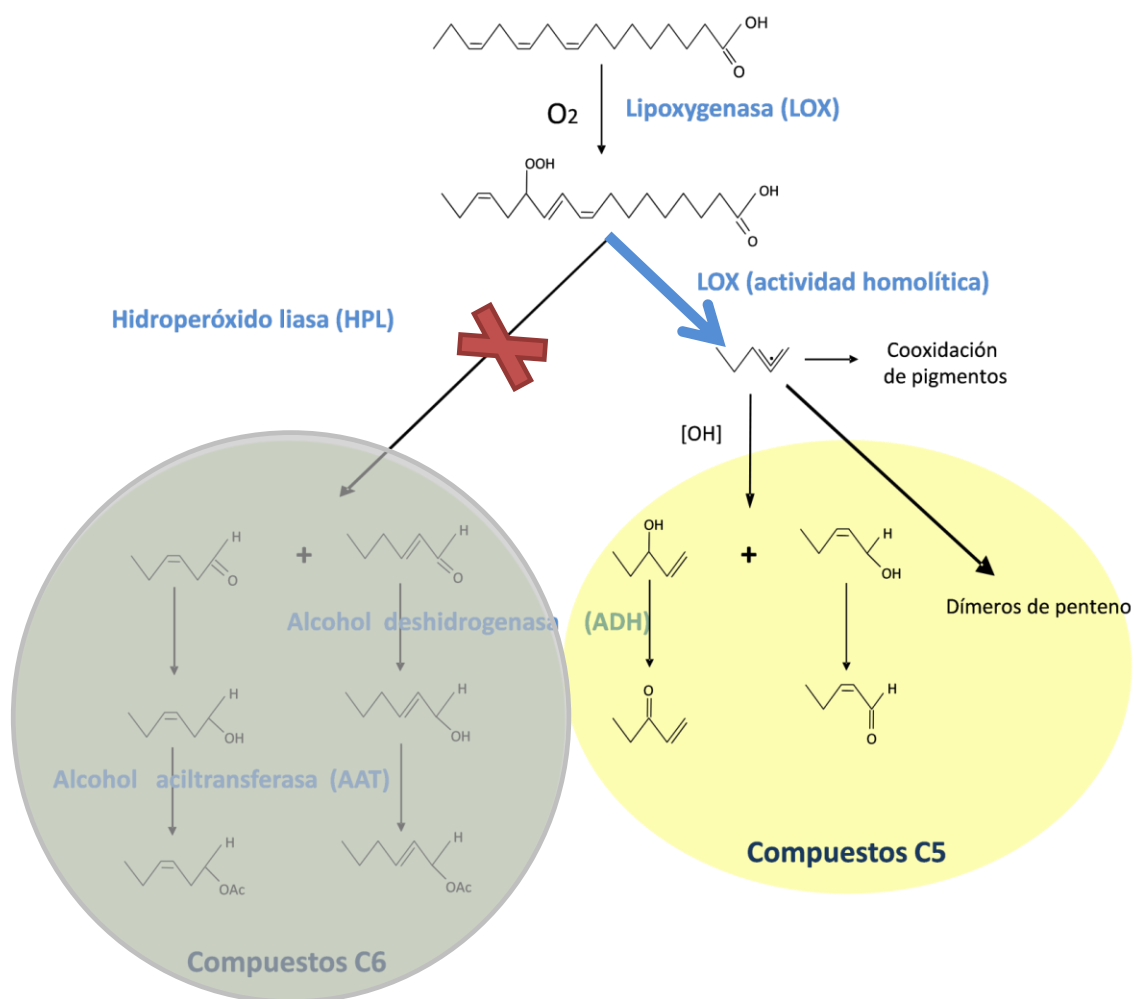
En cuanto a la relación entre actividad enzimática y expresión génica, como ocurría con el estudio de las variedades de la CN-36, no se observaron correlaciones significativas entre la actividad enzimática LOX y la expresión de los correspondientes genes. De manera similar, no se encontró correlación significativa entre el nivel de actividad HPL y la expresión del gen *OeHPL*. Por otra parte, a diferencia de lo observado en las variedades, no se encontró correlación de la expresión del gen *OeHPL* con los genes *LOX2*, lo que podría indicar que en los parentales de las líneas estudiadas los fenómenos de coexpresión son poco significativos. Sin embargo, es de destacar el relativamente alto grado de correlación entre las actividades LOX y HPL (Tab. 13 C), lo que pondría de manifiesto nuevamente su coregulación.

El hecho de existir un único gen *HPL* en olivo y su carácter estricto 13-HPL (Padilla et al, 2010) hace a este gen clave en el tipo de compuestos que se encuentran en la fracción volátil del AOV. En este sentido, se ha realizado un estudio de caracterización funcional del gen *OeHPL* en líneas transgénicas de olivo que sobreexpresaban o tenían silenciada la expresión de este gen. Para ello, se ha medido el nivel de expresión génica, actividad enzimática y contenido en compuestos volátiles en las hojas de los olivos transgénicos, dado que comparten la misma ruta de síntesis de compuestos volátiles que el fruto. En cuanto a las líneas que presentaban sobreexpresión del gen *OeHPL*, la mayoría revelaron un aumento de expresión génica con respecto al control. En general, no se observaron fenómenos de cosupresión. El análisis de expresión génica del gen *OeHPL* reveló que la mayoría de las líneas que presentaban silenciamiento por RNAi presentaban un descenso notable de la expresión génica con respecto a la línea control, en algunos casos este descenso era de hasta un 75 %. Sólo dos líneas obtenidas por silenciamiento antisentido presentaron una disminución en la expresión relativa del gen *OeHPL*. Para un análisis más detallado se seleccionaron líneas de interés, dos procedentes de la sobreexpresión del gen *OeHPL*, dos con silenciamiento antisentido y tres con silenciamiento por RNAi.

El análisis de la actividad enzimática HPL reveló que las tres líneas que presentaban el silenciamiento por RNAi mostraban una reducción significativa de la actividad enzimática HPL, mientras que las líneas silenciadas por RNA antisentido no

mostraron cambios de actividad significativos con respecto a la línea control. En el caso de las líneas con sobreexpresión, el resultado fue un aumento en la actividad HPL.

El análisis de compuestos volátiles en homogeneizados de hoja de las líneas seleccionadas mostró un descenso significativo del nivel de compuestos C6/LnA en aquellas que presentaban el silenciamiento por RNAi, acompañado de un fuerte incremento del contenido de compuestos C5/LnA. Como cabría esperar para un gen cuya expresión tiene carácter constitutivo y proporciona un nivel de actividad HPL basal relativamente alto en los tejidos, las líneas que presentaban sobreexpresión del gen *OeHPL* no mostraron ningún cambio significativo en el contenido de compuestos volátiles a pesar de presentar unos niveles de actividad HPL considerablemente superiores a las líneas control. Esto indica que el nivel de actividad 13-HPL no parece ser el factor limitante en la biosíntesis de compuestos volátiles (Sánchez-Ortiz et al., 2013). Tampoco se encontraron diferencias en el caso de las líneas antisentido, como cabía esperar ya que no se habían encontrado cambios significativos en el nivel de actividad 13-HPL. Como se ha comentado anteriormente, en las líneas con silenciamiento por RNAi se observó un aumento significativo del contenido en compuestos C5/LnA. Este resultado indica que la síntesis de compuestos C5 estaría mediada por una 13-LOX que dispondría de una mayor cantidad del sustrato 13-hidroperóxido, ya que no podría ser metabolizado por la 13-HPL para la formación de los compuestos C6 (Fig. 33). Este efecto ya ha sido descrito en hojas de patata que presentaban un silenciamiento del gen *HPL* mediado por RNA antisentido (Vancanneyt et al., 2001). En este sentido, Shen et al. (2014) han observado recientemente que en tomate se producía un aumento en la síntesis de compuestos C5 cuando la actividad HPL estaba parcialmente disminuida como consecuencia del silenciamiento del gen *LeHPL* por RNAi.



**Figura 33. Ruta de biosíntesis de compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen a partir de ácido linolénico en hojas que presentan silenciamiento del gen *OeHPL*.**

El fenotipo observado en las líneas RNAi (Fig. 30) sugiere un papel de la 13-HPL en el desarrollo de la planta. Recientemente, Savchenko et al. (2017) han descrito un posible papel de la HPL en la protección frente a la inhibición de la fotosíntesis en *Arabidopsis*, lo que podría tener implicaciones en el desarrollo de las plantas.

Por último, la gran variabilidad encontrada con respecto al contenido en compuestos volátiles en las variedades estudiadas, junto con el estudio de las enzimas y genes implicados en la biosíntesis de compuestos volátiles permitirá desarrollar nuevas herramientas biotecnológicas que puedan contribuir a mejorar la calidad del AOV. Más aún, el conocimiento de los factores implicados en su regulación ayudará a establecer tanto las condiciones óptimas de cultivo del olivo y de recogida de la aceituna como la determinación de los parámetros tecnológicos más adecuados durante el proceso de obtención del AOV.



## **VI. Conclusiones**



## VI. CONCLUSIONES

- 1- Se ha aislado y secuenciado un clon completo de cDNA de olivo que codifica una lipoxigenasa (*Oep3LOX2*), cuya secuencia de aminoácidos deducida muestra las características típicas de enzimas LOXs de tipo 2 y actividad 13-LOX. El análisis filogenético sitúa efectivamente al gen *Oep3LOX2* en una rama junto a las LOXs de tipo 2 y actividad 13-LOX.
- 2- El análisis de expresión del gen *Oe3LOX2* en distintos tejidos de las variedades Picual y Arbequina, así como a lo largo del desarrollo y maduración de la aceituna puso de manifiesto que está regulado de forma espacial y temporal. Asimismo, la temperatura y la oscuridad regulan su transcripción, mientras que el daño por herida y el estrés hídrico provocan un incremento en su nivel de expresión relativa.
- 3- El perfil de compuestos volátiles analizados en los aceites de las variedades de olivo recogidas en la colección nuclear CN-36 mostró una amplia variabilidad. La fracción de compuestos volátiles mayoritaria correspondió a los compuestos de seis átomos de carbono derivados del ácido linolénico, lo que pone de manifiesto la prevalencia de la rama heterolítica de la ruta de la lipoxigenasa, generadora de este tipo de compuestos, sobre la rama homolítica generadora de los compuestos de cinco átomos de carbono.
- 4- Tanto en variedades como en líneas procedentes de un cruzamiento Picual x Arbequina se observó un aumento en el contenido de compuestos volátiles a lo largo de la maduración del fruto que coincide con un incremento en el nivel de expresión del gen *Oe2LOX2*, cuya proteína sería la principal responsable de la síntesis de compuestos volátiles durante el proceso de extracción del aceite de oliva virgen. Además, se observó una correulación transcripcional de este gen con los genes *Oe3LOX2* y *OeHPL*, lo que pone de manifiesto el papel de estas tres enzimas en la biosíntesis de compuestos volátiles durante el proceso de extracción del aceite de oliva virgen.

- 5- Se detectó una baja correlación entre los niveles de expresión de los genes *LOX2* y *HPL*, y los de actividad de las correspondientes enzimas, tanto en variedades como en líneas procedentes de un cruzamiento Picual x Arbequina, indicando la posible existencia de mecanismos de regulación de la actividad enzimática.
- 6- En las líneas transgénicas de olivo que sobreexpresaban el gen *OeHPL* se observó un aumento de la actividad enzimática HPL y un ligero incremento en el contenido de compuestos volátiles con respecto al control. Por el contrario, en las líneas silenciadas mediante RNAi, que mostraban una severa reducción en su desarrollo, se detectó una fuerte disminución de la actividad HPL, y un importante descenso de los compuestos C6/LnA junto con un aumento significativo del contenido en compuestos C5/LnA. Todos estos datos ponen de manifiesto el papel clave que juega la 13-HPL en la biosíntesis de los compuestos volátiles de seis átomos de carbono (C6).





## **VII. Bibliografía**



- Aharoni, a, Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H. a, Blaas, J., Van Houwelingen, a. M.M.L., De Vos, R.C.H., Van Der Voet, H., Jansen, R.C., Guis, M., Mol, J., Davis, R.W., Schena, M., Van Tunen, a J., O'Connell, a P., 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12, 647–661. doi:10.2307/3870992
- Angerosa, F., 2002. Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 639–660.
- Angerosa, F., Basti, C., 2001. Olive oil volatile compounds from the lipoxygenase pathway in relation to fruit ripeness. *Ital. J. food Sci.* 13, 421–428.
- Angerosa, F., Basti, C., Vito, R., 1999. Virgin Olive Oil Volatile Compounds from Lipoxygenase Pathway and Characterization of Some Italian Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 47, 836–839.
- Angerosa, F., Camera, L., D'Alessandro, N., Giorgio, M., 1998. Characterization of Seven New Hydrocarbon Compounds Present in the Aroma of Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* 46, 648–653. doi:10.1021/JF970352Y
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R., 2000. Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chem.* 68, 283–287. doi:10.1016/S0308-8146(99)00189-2
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G., 2004. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J. Chromatogr. A* 1054, 17–31. doi:10.1016/j.chroma.2004.07.093
- Aparicio, R., Aparicio-Ruiz, R., García-González, D.L., 2007. Rapid methods for testing of oil authenticity: The case of olive oil. *En: Rapid Methods.*
- Aparicio, R., Aparicio-Ruiz, R., 2000. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A* 881, 93–104. doi:10.1016/S0021-9673(00)00355-1

- Aparicio, R., Luna, G., 2002. Characterisation of monovarietal virgin olive oils. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104, 614–627. doi:10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L
- Aparicio, R., Morales, M.T., 1998. Characterisation of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. J. Agric. Food Chem. 46, 1116–1122.
- Aparicio, R., Morales, M.T., Alonso, M. V., 1996. Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory wheel. J. Am. Oil Chem. Soc. 73, 1253–1264. doi:10.1007/BF02525454
- Aparicio, R., Rocha, S.M., Delgadillo, I., Morales, M.T., 2000. Detection of Rancid Defect in Virgin Olive Oil by the Electronic Nose. J. Agric. Food Chem. 48, 853–860. doi:10.1021/JF9814087
- Aragüez, I., Valpuesta, V., 2013. Metabolic engineering of aroma components in fruits. Biotechnol. J. 8, 1144–58. doi:10.1002/biot.201300113
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M., Laakso, S., 1981. Lipids Part C, Methods in Enzymology, Methods in Enzymology. Elsevier. doi:10.1016/0076-6879(81)71055-3
- Beekwilder, J., Alvarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F.W.A., Bouwmeester, H.J., Aharoni, A., 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. Plant Physiol. 135, 1865–78. doi:10.1104/pp.104.042580
- Belaj, A., Dominguez-García, M. del C., Atienza, S.G., Martín Urdíroz, N., De la Rosa, R., Satovic, Z., Martín, A., Kilian, A., Trujillo, I., Valpuesta, V., Del Río, C., 2012. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. Tree Genet. Genomes 8, 365–378. doi:10.1007/s11295-011-0447-6
- Bell, E., Mullet, J.E., 1991. Lipxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. MGG Mol. Gen. Genet. 230, 456–462. doi:10.1007/BF00280303
- Benelli, G., Caruso, G., Giunti, G., Cuzzola, A., Saba, A., Raffaelli, A., Gucci, R., 2015.

- Changes in olive oil volatile organic compounds induced by water status and light environment in canopies of *Olea europaea* L. trees. J. Sci. Food Agric. 95, 2473–2481. doi:10.1002/jsfa.6977
- Blée, E., 1996. Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes, Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes. AOCS Press, Illinois.
- Boskou, D., 2011. Olive Oil, in: Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 243–271. doi:10.1002/9781444339925.ch9
- Boskou, D., 1996. Olive Oil. Chemistry and Technology.
- Boss, A., Bishop, K., Marlow, G., Barnett, M., Ferguson, L., 2016. Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. Nutrients 8, 513. doi:10.3390/nu8080513
- Boyington, J., Gaffney, B., Amzel, L., 1993. The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. Science (80-. ). 260, 1482–1486. doi:10.1126/science.8502991
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 254, 248–254.
- Chedgy, R.J., Köllner, T.G., Constabel, C.P., 2015. Functional characterization of two acyltransferases from *Populus trichocarpa* capable of synthesizing benzyl benzoate and salicyl benzoate, potential intermediates in salicinoid phenolic glycoside biosynthesis. Phytochemistry 113, 149–159. doi:10.1016/j.phytochem.2014.10.018
- Chervin, C., Truett, J.K., Speirs, J., 1999. Alcohol dehydrogenase expression and alcohol production during pear ripening. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 124, 71–75.
- Coffa, G., Brash, A.R., 2004. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: Stereocontrol is linked to the position of oxygenation. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 15579–15584. doi:10.1073/pnas.0406727101
- Connor, D.J., Fereres, E., 2005. The Physiology of Adaptation and Yield Expression in

- Olive. Hortic. Rev. (Am. Soc. Hortic. Sci). 31, 155–229.  
doi:10.1002/9780470650882.ch4
- Criado, M., Motilva, M., Ramo, T., Romero, M., 2006. Chlorophyll and carotenoid profile and enzymatic activities (chlorophyllase and lipoxygenase) in olive drupes from the fruit-setting period to harvest time. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 131, 593–600.
- D’Auria, J.C., Chen, F., Pichersky, 2003. The SABATH family of MTS in Arabidopsis thaliana and other plant species. Integr. Phytochem. From Ethnobot. To Mol. Ecol. 37, 96–125.
- Di Giovacchino, L., Sestili, S., Di Vincenzo, D., 2002. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104, 587–601.  
doi:10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M
- Dohi, T., Anamura, S., Shirakawa, M., Okamoto, H., Tsujimoto, A., 1991. Inhibition of Lipoxygenase by Phenolic compounds. Jpn. J. Pharmacol. 55, 547–550.  
doi:10.1254/jjp.55.547
- El-Sharkawy, I., Manríquez, D., Flores, F.B., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J.C., 2005. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. Plant Mol. Biol. 59, 345–362. doi:10.1007/s11103-005-8884-y
- Evans, C.D., Moser, H.A., List, G.R., 1971. Odor and flavor responses to additives in edible oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 48, 495–498. doi:10.1007/BF02544669
- Farmaki, T., Sanmartin, M., Jimenez, P., Paneque, M., Sanz, C., Vancanneyt, G., Leon, J., Sanchez-Serrano, J.J., 2007. Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. J. Exp. Bot. 58, 555–568.  
doi:10.1093/jxb/erl230
- Fedeli, E., 1977. Caratteristiche organolettiche dell’olio di oliva. Riv. Ital. Sostanze Gras 54, 202–205.
- Fellman, J.K., Matheis, J.P., Mattinson, D.S., Bostick, B., 1991. Assay of acetyl CoA alcohol transferase in “Delicious” apples. Hortscience 26, 773.

- Feussner, I., Balkenhohl, T.J., Porzel, A., Kuhn, H., Wasternack, C., 1997. Structural Elucidation of Oxygenated Storage Lipids in Cucumber Cotyledons: Implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination. *J. Biol. Chem.* 272, 21635–21641. doi:10.1074/jbc.272.34.21635
- Feussner, I., Wasternack, C., 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 275–297. doi:10.1146/annurev.physchem.53.082201.124330
- Fisher, A., Grimes, H.D., Fall, R., 2003. The biochemical origin of pentenol emissions from wounded leaves. *Phytochemistry* 62, 159–163. doi:10.1016/S0031-9422(02)00521-6
- Flath, R.A., Forrey, R.R., Guadagni, D.G., 1973. Aroma components of olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 21, 948–952. doi:10.1021/jf60190a030
- García-González, D.L., Aparicio-Ruiz, R., Aparicio, R., 2008. Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 602–607. doi:10.1002/ejlt.200700262
- García-Maraver, A., Zamorano, M., Ramos-Ridao, A., Díaz, L.F., 2012. Analysis of olive grove residual biomass potential for electric and thermal energy generation in Andalusia (Spain). *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 745–751. doi:10.1016/j.rser.2011.08.040
- García-Vico, L., Belaj, A., Sánchez-Ortiz, A., Martínez-Rivas, J., Pérez, A., Sanz, C., 2017. Volatile Compound Profiling by HS-SPME/GC-MS-FID of a Core Olive Cultivar Collection as a Tool for Aroma Improvement of Virgin Olive Oil. *Molecules* 22, 141. doi:10.3390/molecules22010141
- Gardner, H.W., Grove, M.J., Salch, Y.P., 1996. Enzymic pathway to ethyl vinyl ketone and 2-pentenol in soybean preparations. *J. Agric. Food Chem.* 44, 882–886. doi:10.1021/jf950509r
- Gavel, Y., von Heijne, G., 1990. A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett.* 261, 455–458. doi:10.1016/0014-5793(90)80614-O
- Gómez-Rico, A., Salvador, M.D., La Greca, M., Gregapane, G., 2006. Phenolic and Volatile Compounds of Extra Virgin Olive Oil ( *Olea europaea* L . Cv .

- Cornicabra ) with Regard to Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7130–7136.
- Grebner, W., Stingl, N.E., Oenel, A., Mueller, M.J., Berger, S., 2013. Lipoxygenase6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161, 2159–70.  
doi:10.1104/pp.113.214544
- Grechkin, A.N., Fazliev, F.N., Mukhtarova, L.S., 1995. The lipoxygenase pathway in garlic (*Allium sativum* L.) bulbs: detection of the novel divinyl ether oxylipins. *FEBS Lett.* 371, 159–162.
- Grosch, W., 1994. Determination of Potent Odourants in Foods by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) and Calculation of Odour Activity Values (OAVs). *Flavour Fragr. J.* 9, 147–158. doi:10.1002/ffj.2730090403
- Hamberg, M., Samuelsson, B., 1967. Oxygenation the Vesicular of Unsaturated Fatty Gland of Sheep. *J. Biol. Chem.* 242, 5344–5354.
- Hatanaka, A., Kajiwarra, T., Horino, H., Inokuchi, K.I., 1992. Odor-structure relationships in n-hexanols and n-hexenales. *Z. Naturforsch* 47, 183–189.
- Heitz, T., Bergey, D.R., Ryan, C.A., 1997. A Gene Encoding a Chloroplast-Targeted Lipoxygenase in Tomato Leaves Is Transiently Induced by Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *Plant Physiol.* 114, 1085–1093. doi:10.1104/pp.114.3.1085
- Hermoso, M., Uceda, M., Garcia, A., Morales, B., Frias, M.L., Fernandez, A., 1991. *Elaboración de Aceite de oliva de calidad*. Sevilla, Junta de Andalucía, Dirección General de Investigación, Tecnología y Formación Agroalimentaria y Pesquera., 3rd ed.
- Holland, D., Larkov, O., Bar-Ya'akov, I., Bar, E., Zax, A., Brandeis, E., Ravid, U., Lewinsohn, E., 2005. Developmental and varietal differences in volatile ester formation and acetyl-CoA: alcohol acetyl transferase activities in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7198–203.  
doi:10.1021/jf050519k
- Holtman, W.L., Vredenburg-Heistek, J.C., Schmitt, N.F., Feussner, I., 1997. Lipoxygenase-2 Oxygenates Storage Lipids in Embryos of Germinating Barley.

- Eur. J. Biochem. 248, 452–458. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00452.x
- Hornung, E., Walther, M., Kuhn, H., Feussner, I., 1999. Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4192–4197. doi:10.1073/pnas.96.7.4192
- Iaria, D.L., Bruno, L., Macchione, B., Tagarelli, A., Sindona, G., Giannino, D., Bitonti, M.B., Chiappetta, A., 2012. The aroma biogenesis-related *Olea europaea* alcohol dehydrogenase gene is developmentally regulated in the fruits of two *O. europaea* L. cultivars. *Food Res. Int.* 49, 720–727. doi:10.1016/j.foodres.2012.09.004
- Kalua, C.M., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K., 2007. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chem.* 100, 273–286. doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.059
- Kalua, C.M., Bedgood, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., 2006. Changes in Volatile and Phenolic Compounds with Malaxation Time and Temperature during Virgin Olive Oil Production. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7641–7651.
- Koidis, A., Boskou, D., 2006. The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 323–328. doi:10.1002/ejlt.200500319
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Luaces, P., Pérez, A.G., Sanz, C., 2003. Role of olive seed in the biogenesis of virgin olive oil aroma. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4741–4745.
- Luaces, P., Pérez, a, Sanz, C., 2006. Effect of the blanching process and olive fruit temperature at milling on the biosynthesis of olive oil aroma. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 11–17. doi:10.1007/s00217-006-0282-4
- Luaces, P., Romero, C., Gutierrez, F., Sanz, C., Ana, G.P., 2007a. Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric.* 87, 2721–2727. doi:10.1002/jsfa
- Luaces, P., Sanz, C., Pérez, A.G., 2007b. Thermal stability of lipoxygenase and



- hydroperoxide lyase from olive fruit and repercussion on olive oil aroma biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6309–6313.
- Luna, G., Morales, M.T., Aparicio, R., 2006a. Changes Induced by UV Radiation during Virgin Olive Oil Storage. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4790–4794. doi:10.1021/JF0529262
- Luna, G., Morales, M.T., Aparicio, R., 2006b. Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chem.* 98, 243–252. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.069
- Maccarrone, M., Veldink, G.A., Agrof, A.F., Vliegthart, J.F.G., 1995. Modulation of soybean lipoxygenase expression and membrane oxidation by water deficit. *FEBS Lett.* 371, 223–226. doi:10.1016/0014-5793(95)00876-B
- Martínez, J., Muñoz, E., Alba, J., Lanzón, A., 1975. Report about the use of the “Abencor” analyser. *Grasas y Aceites* 26, 379–385.
- Mateos, R., Domínguez, M.M., Espartero, J.L., Cert, A., 2003. Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7170–5. doi:10.1021/jf034415q
- Matsui, K., 2006. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 274–280. doi:10.1016/j.pbi.2006.03.002
- Minor, W., Steczko, J., Bolin, J.T., Otwinowski, Z., Axelrod, B., 1993. Crystallographic determination of the active site iron and its ligands in soybean lipoxygenase L-1. *Biochemistry* 32, 6320–6323. doi:10.1021/bi00076a003
- Minor, W., Steczko, J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin, J.T., Walter, R., Axelrod, B., 1996. Crystal Structure of Soybean Lipoxygenase L-1 at 1.4 Å Resolution. *Biochemistry* 35, 10687–10701. doi:10.1021/bi960576u
- Morales, M.T., Alonso, M. V, Rios, J.J., Aparicio, R., De, I., Csic, G., Tejero, A.P.G., 1995. Virgin Olive Oil Aroma : Relationship between Volatile Compounds and Sensory Attributes by Chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2925–2931.
- Morales, M.T., Aparicio, R., 1999. Effect of extraction conditions on sensory quality of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 295–300. doi:10.1007/s11746-999-

0234-9

- Morales, M.T., León-Camacho, M., 2000. Gas and liquid chromatography: Methodology applied to olive oil., in: Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. pp. 159–208.
- Morales, M.T., Luna, G., Aparicio, R., 2005. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. Food Chem. 91, 293–301. doi:10.1016/j.foodchem.2004.06.011
- Morales, M.T., Tsimidou, M., 2000. The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality, in: Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. pp. 393–458.
- Mulinacci, N., Giaccherini, C., Innocenti, M., Romani, A., Vincieri, F.F., Marotta, F., Mattei, A., 2005. Analysis of extra virgin olive oils from stoned olives. J. Sci. Food Agric. 85, 662–670. doi:10.1002/jsfa.1982
- Muñoz-Mérida, A., González-Plaza, J.J., Cañada, A., Blanco, A.M., García-López, M.D.C., Rodríguez, J.M., Pedrola, L., Sicardo, M.D., Hernández, M.L., De la Rosa, R., Belaj, A., Gil-Borja, M., Luque, F., Martínez-Rivas, J.M., Pisano, D.G., Trelles, O., Valpuesta, V., Beuzón, C.R., 2013. De novo assembly and functional annotation of the olive (*Olea europaea*) transcriptome. DNA Res. 20, 93–108. doi:10.1093/dnares/dss036
- Olias, J.M., Perez, A.G., Rios, J.J., Sanz, L.C., 1993. Aroma of Virgin Olive Oil : Biogenesis of the “ Green ” Odor Notes. J. Agric. Food Chem. 41, 2368–2373.
- Olías, J.M., Sanz, C., Rios, J.J., Pérez, A.G., 1995. Substrate-specificity of alcohol acyltransferase from strawberry and banana fruits. Fruit flavors Biog. Charact. Authentication 596, 134–141.
- Padilla, M.N., Hernández, M.L., Pérez, A.G., Sanz, C., Martínez-Rivas, J.M., 2010. Isolation, expression, and characterization of a 13-hydroperoxide lyase gene from olive fruit related to the biosynthesis of the main virgin olive oil aroma compounds. J. Agric. Food Chem. 58, 5649–57. doi:10.1021/jf9045396
- Padilla, M.N., Hernández, M.L., Sanz, C., Martínez-Rivas, J.M., 2014. Stress-dependent regulation of 13-lipoxygenases and 13-hydroperoxide lyase in olive fruit mesocarp.

- Phytochemistry 102, 80–88. doi:10.1016/j.phytochem.2014.01.024
- Padilla, M.N., Hernández, M.L., Sanz, C., Martínez-Rivas, J.M., 2012a. Molecular cloning, functional characterization and transcriptional regulation of a 9-lipoxygenase gene from olive. *Phytochemistry* 74, 58–68. doi:10.1016/j.phytochem.2011.11.006
- Padilla, M.N., Hernández, M.L., Sanz, C., Martínez-Rivas, J.M., 2009. Functional characterization of two 13-lipoxygenase genes from olive fruit in relation to the biosynthesis of volatile compounds of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9097–107. doi:10.1021/jf901777j
- Padilla, M.N., Martínez-rivas, J.M., Pe, A.G., Sanz, C., 2012b. Thermal Inactivation Kinetics of Recombinant Proteins of the Lipoxygenase Pathway Related to the Synthesis of Virgin Olive Oil Volatile Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6477–6482.
- Palmieri-Thiers, C., Canaan, S., Brunini, V., Lorenzi, V., Tomi, F., Desseyn, J.-L., Garscha, U., Oliw, E.H., Berti, L., Maury, J., 2009. A lipoxygenase with dual positional specificity is expressed in olives (*Olea europaea* L.) during ripening. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 339–346.
- Panzanaro, S., Nutricati, E., Miceli, A., De Bellis, L., 2010. Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 48, 741–745. doi:10.1016/j.plaphy.2010.05.004
- Pérez, A.G., de la Rosa, R., Pascual, M., Sánchez-Ortiz, A., Romero-Segura, C., León, L., Sanz, C., 2016. Assessment of volatile compound profiles and the deduced sensory significance of virgin olive oils from the progeny of Picual×Arbequina cultivars. *J. Chromatogr. A* 1428, 305–315. doi:10.1016/j.chroma.2015.07.055
- Pérez, A.G., Luaces, P., Ríos, J.J., García, J.M., Sanz, C., 2003. Modification of volatile compound profile of virgin olive oil due to hot-water treatment of olive fruit. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6544–6549.
- Pinsky, A., Grossman, S., Trop, M., 1971. Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 36, 571–572. doi:10.1111/j.1365-2621.1971.tb15131.x

- Porta, H., Rueda-Benitez, P., Campos, F., Colmenero-Flores, J., Colorado, J., Carmona, M., Covarrubias, A., Rocha-Sosa, M., 1999. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 40, 850–858.
- Rapoport, H.F., 2001. Botánica y Morfología En: El Cultivo del Olivo. Mundiprensa: 35-60. Mundi-Prensa Libros.
- Reiners, J., Grosch, W., 1998. Odorants of Virgin Olive Oils with Different Flavor Profiles. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2754–2763. doi:10.1021/jf970940b
- Royo, J., Vancanneyt, G., Pérez, A.G., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S., Sánchez-Serrano, J.J., 1996. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.* 271, 21012–9. doi:10.1074/JBC.271.35.21012
- Salas, J., Sanchez, J., 1999. Hydroperoxide Lyase from Olive (*Olea europaea*) Fruits. *Plant Sci.* 143, 19–26.
- Salas, J., Sanchez, J., 1998. Alcohol dehydrogenase from olive (*Olea europaea*) fruit. *Phytochemistry* 48, 35–40.
- Salas, J.J., Williams, M., Harwood, J.L., Sánchez, J., 1999. Lipoxygenase Activity in Olive ( *Olea europaea* ) Fruit. *JAOCs* 76, 1163–1168.
- Salch, Y.P., Grove, M.J., Takamura, H., Gardner, H.W., 1995. Characterization of a C-5, 13-Cleaving Enzyme of 1,3 (S)-Hydroperoxide of Linolenic Acid by Soybean Seed. *Plant Physiol.* 108, 1211–1218.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Ortiz, A., Pérez, A.G., Sanz, C., 2013. Synthesis of aroma compounds of virgin olive oil: Significance of the cleavage of polyunsaturated fatty acid hydroperoxides during the oil extraction process. *Food Res. Int.* 54, 1972–1978. doi:10.1016/j.foodres.2013.03.045
- Sánchez-Ortiz, A., Pérez, A.G., Sanz, C., 2007. Cultivar Differences on Nonesterified Polyunsaturated Fatty Acid as a Limiting Factor for the Biogenesis of Virgin Olive

- Oil Aroma. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7869–7873.
- Sánchez-Ortiz, A., Pérez, A.G., Sanz, C., 2007. Cultivar Differences on Nonesterified Polyunsaturated Fatty Acid as a Limiting Factor for the Biogenesis of Virgin Olive Oil Aroma. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7869–7873. doi:10.1021/jf071202i
- Sanchez-Ortiz, A., Romero-segura, C., Gazda, V.E., Graham, I.A., Sanz, C., Perez, A.G., 2012a. Factors Limiting the Synthesis of Virgin Olive Oil Volatile Esters. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1300–1307.
- Sanchez-Ortiz, A., Romero-segura, C., Sanz, C., Perez, A.G., 2012b. Synthesis of Volatile Compounds of Virgin Olive Oil Is Limited by the Lipoxygenase Activity Load during the Oil Extraction Process. *J. Agric. Food Chem.* 60, 812–822.
- Sánchez, G., Venegas-Calcrón, M., Salas, J.J., Monforte, A., Badenes, M.L., Granell, A., 2013. An integrative “omics” approach identifies new candidate genes to impact aroma volatiles in peach fruit. *BMC Genomics* 14, 343. doi:10.1186/1471-2164-14-343
- Sanchez, J., 1994. Lipid photosynthesis in olive fruit. *Prog. Lipid Res.* 33, 97–104. doi:10.1016/0163-7827(94)90012-4
- Savchenko, T., Yanykin, D., Khorobrykh, A., Terentyev, V., Klimov, V., Dehesh, K., 2017. The hydroperoxide lyase branch of the oxylipin pathway protects against photoinhibition of photosynthesis. *Planta* 1–14. doi:10.1007/s00425-017-2674-z
- Schreier, P., 1985. P. Schreier: Chromatographic Studies of Biogenesis of Plant Volatiles. 171 Seiten, 55 Abb., 12 Tab. Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, Basel, New York 1984. Preis 68,– DM; 34,– \$. *Food / Nahrung* 29, 718–719. doi:10.1002/food.19850290726
- Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Selvaggini, R., Montedoro, G., 2007. Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7028–35. doi:10.1021/jf070600i
- Siedow, J., 1991. Plant Lipoxygenase: Structure And Function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 145–188. doi:10.1146/annurev.arplant.42.1.145
- Sloane, D.L., Leung, R., Craik, C.S., Sigal, E., 1991. A primary determinant for

- lipoxygenase positional specificity. *Nature* 354, 149–152. doi:10.1038/354149a0
- Souleyre, E.J.F., Chagné, D., Chen, X., Tomes, S., Turner, R.M., Wang, M.Y., Maddumage, R., Hunt, M.B., Winz, R.A., Wiedow, C., Hamiaux, C., Gardiner, S.E., Rowan, D.D., Atkinson, R.G., 2014. The AAT1 locus is critical for the biosynthesis of esters contributing to “ripe apple” flavour in “Royal Gala” and “Granny Smith” apples. *Plant J.* 78, 903–915. doi:10.1111/tpj.12518
- St-Pierre, B., De Luca, V., 2000. Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. *Evol. Metab. Pathways* 34, 285–315.
- Takeoka, G.R., Flath, R.A., Mon, T.R., Teranishi, R., Guentert, M., 1990. Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*). *J. Agric. Food Chem.* 38, 471–477. doi:10.1021/jf00092a031
- Torreblanca, R., Cerezo, S., Palomo-Ríos, E., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., 2010. Development of a high throughput system for genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) plants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 103, 61–69. doi:10.1007/s11240-010-9754-0
- Tura, D., Failla, O., Bassi, D., Pedò, S., Serraiocco, A., 2008. Cultivar influence on virgin olive (*Olea europea* L.) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 118, 139–148. doi:10.1016/j.scienta.2008.05.030
- Uceda, M.A., Beltran, G., Jimenez, A., 2000. Aceites de oliva virgenes extra: calidad y diversidad., Ed. Patrimonio comunal olivarero. Junta de Andalucía, Sevilla.
- Ueda, Y., Tsuda, A., Bai, J.H., Fujishita, N., Chachin, K., 1992. Characteristic pattern of aroma ester formation from banana, melon, and strawberry with reference to the substrate-specificity of ester synthetase and alcohol contents in pulp. *J. Japanese Soc. Food Sci. Technol. Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 39, 183–187.
- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., Castañera, P., Sánchez-Serrano, J.J., 2001. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8139–44. doi:10.1073/pnas.141079498

- Verhagen, Jan; Bouman, Anneke; Vliegenthart, Johannes and Boldingh, J., 1977.  
Conversion of 9-d- and 13-l-hydroperoxylinoleic acids by soybean lipoxygenase-1  
under anaerobic conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 486, 114–120.
- Vick, B.A., Zimmerman, D.C., 1986. Characterization of 12-oxo-phytodienoic Acid  
reductase in corn: the jasmonic Acid pathway. *Plant Physiol.* 80, 202–205.  
doi:10.1104/pp.80.1.202
- Visioli, F., Grande, S., Bogani, P., Galli, C., 2004. The role of antioxidants in the  
Mediterranean diets: focus on cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 13, 337–343.  
doi:10.1097/01.cej.0000137513.71845.f6
- Yahyaoui, F.E.L., Wongs-Aree, C., Latche, A., Hackett, R., Grierson, D., Pech, J.C.,  
2002. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol  
acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon  
ripening. *Eur. J. Biochem.* 269, 2359–2366. doi:10.1046/j.1432-  
1033.2002.02892.x







**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

